

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Laboratoriotekniikka

2012

Outi Mäkinen

JÄTEVEDEN NITRAATIN JA NITRIITIN VALMISPUTKI- MENETELMIEN VALIDOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Outi Mäkinen

JÄTEVEDEN NITRAATIN JA NITRIITIN VALMISPUTKIMENETELMIEN VALIDOINTI

Tämän opinnäytetyön toimeksiantajana oli Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy. Työn tarkoituksena oli validoida valmisputkimenetelmät jäteveden nitraatin ja nitriitin määrittämiselle. Yrityksessä oli jo ennestään käytössä toinen menetelmä, jossa nitraatti ja nitriitti analysoitiin FIA-analysaattorilla.

Kuntien tehtävänä on huolehtia vesihuollosta, joka tarkoittaa kaikkia vaiheita vedenhankinnasta jätevesien käsittelyyn. Jätevesien käsittelyn onnistumista ja vesien tilaa valvotaan lakisääteisillä velvoitetarkkailuilla. Typpiyhdisteiden poistoa valvotaan niiden rehevöittävän vaikutuksen takia. Typpiyhdisteiden poistoon käytetään Suomessa nitrifikaatio-denitrifikaatio –menetelmää, jossa pelkistyneet typpiyhdisteet hapetetaan ensin nitraatiksi ja sen jälkeen pelkistetään typpikaasuksi, joka haihtuu ilmaan.

Validoitaviksi menetelmiksi valittiin Hach Langen valmisputkimenetelmät, joissa käytettiin nitraatin analysoimiseen kyvettitestä LCK 339 ja nitriitin analysoimiseen reagenssisarjaa LCK 541 sekä siihen liittyviä 5 cm kyvettejä LZP 341. Analysoinnissa käytettiin Hach Langen spektrofotometriä DR 2800 ja Perkin Elmerin spektrofotometriä Lambda 12.

Validoinnissa määritettiin molempien menetelmien lineaarisuus, määrittämisraja, systemaattinen virhe, satunnaisvirhe, tarkkuus, mittausepävarmuus, aallonpituusmaksimi ja optimimittausaika. Lisäksi tutkittiin näytteiden stabiilisuutta sekä lämpötilan ja näytteenkäsittelyn vaikutusta.

Kummankin menetelmän yksittäisistä validointitesteistä osa täytti vaatimukset ja osa ei. Tulokset, jotka eivät täyttäneet vaatimuksia, johtuivat osin menetelmien pienestä pitoisuustasosta ja osin mm. uuden ja vanhan menetelmän erilaisista näytteenkäsittelyistä. Vanhaan menetelmään verrattuna tuloksilla ei kuitenkaan voitu sanoa olevan merkittävää eroa. Molemmat menetelmät otettiin laboratorioissa käyttöön. Kumpaankin menetelmään lisättiin samanlainen näytteenkäsittely kuin FIA-menetelmässä. Molemmat menetelmät myös akkreditoitiin.

ASIASANAT:

Validointi, nitraatti, nitriitti, jätevesi, spektrofotometria

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

April 2012 | 45 pages

Instructors: Niina Kohonen, Taina Hovinen

Outi Mäkinen

VALIDATION OF CUVETTE TEST FOR ANALYZING NITRATE AND NITRITE FROM WASTEWATER

The commissioner of this thesis was Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy. The objective was to validate analysis methods for analyzing nitrate and nitrite from wastewater. The corporation already had a method for analyzing nitrate and nitrite from wastewater with a flow injection analyzer.

The duty of municipalities is to take care of water service, which means all the steps from water supply to wastewater treatment. There are laws that mandate monitoring the effectiveness of the treatment process and the condition of the water systems. The removal of nitrogen compounds is monitored because of the eutrophicating effect of nitrogen. In Finland removing nitrogen compounds is performed by a method called nitrification-denitrification. First reduced nitrogen compounds are oxidized to nitrate. After oxidizing, the nitrate is reduced to nitrogen, which evaporates to air.

The corporation selected Hach Lange's cuvette tests LCK 339 for nitrate and LCK 541 for nitrite and the cuvettes LQP 341 used in the nitrite test to be validated. The validation samples were measured with Hach Lange's spectrophotometer DR 2800 and Perkin Elmer's spectrophotometer Lambda 12.

During validation the linearity, limit of determination, systematic and random errors, accuracy, measurement uncertainty, maximum wavelength and optimal measurement time were determined. The stability of the samples and effect of the temperature and sample handling were also examined.

The results of the individual validation tests were both desirable and undesirable. Undesirable results were caused partly by the low concentration level of the methods and partly by the sample handling differences between the old and the new methods. However, the results of the new and the old methods were compared and there was no significant difference. Both of the new methods were found suitable for use. The sample handling used in the old method was added to both of the new methods. Both methods were also accredited.

KEYWORDS:

validation, nitrate, nitrite, wastewater, spectrophotometry

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
2 VESIHUOLTO	8
2.1 Velvoitetarkkailut	8
2.2 Jäteveden käsittely	9
3 TYPEN POISTO JÄTEVEDESTÄ	10
3.1 Typen lähteet	10
3.2 Typen muodot jätevedessä	11
3.3 Nitrifikaatio-denitrifikaatio	11
3.3.1 Nitrifikaatio	12
3.3.2 Denitrifikaatio	12
4 MENETELMÄT, LAITTEET JA VÄLINEET	14
4.1 Nitraatin ja nitriitin määrittäminen FIA-tekniikalla	14
4.2 Nitraatin ja nitriitin määrittäminen Hach Langen valmisputkimenetelmällä	14
4.3 Spektrofotometri Hach Lange DR 2800	15
4.4 Spektrofotometri Perkin Elmer Lambda 12	17
4.5 Valmisputkipakkaukset	17
4.5.1 LCK 339	18
4.5.2 LCK 541 ja LZF 341	19
5 VALIDOINTI	20
5.1 Aallonpituusmaksimi ja mittausaika	20
5.2 Lineaarisuus	21
5.3 Määrittämiss raja	22
5.4 Systemaattinen virhe	23
5.5 Satunnaisvirhe	24
5.6 Tarkkuus	25
5.7 Mittausepävarmuus	26
5.8 Näyteliuoksen stabiilisuus	27
5.9 Lämpötilan vaikutus	27
5.10 Näytteen käsittelyn vaikutus	28
5.11 Menetelmävertailu	28

6 TULOKSET	30
6.1 Aallonpituusmaksimi ja mittausaika	30
6.2 Lineaarisuus	33
6.3 Määrittäysraja	36
6.4 Systemaattinen virhe	36
6.5 Satunnaisvirhe	36
6.6 Tarkkuus	38
6.7 Mittausepävarmuus	38
6.8 Näyteliuksen stabiilisuus, lämpötilan ja näytteenkäsittelyn vaikutus	39
6.9 Menetelmävertailu	39
7 YHTEENVETO	42
LÄHTEET	45

LIITTEET

- Liite 1. Valmisputkipakkauksen LCK 339 analyysiohje
- Liite 2. Reagenssisarjan LCK 541 analyysiohje
- Liite 3. Validoinnissa mitattujen näytteiden mittaustulokset

KUVAT

Kuva 1. DR 2800 -Spektrofotometri. (10)	15
Kuva 2. DR 2800 -spektrofotometrin kyvetiaukot. (10)	16
Kuva 3. Hach Langen kyvettitestit ja kyvetit. (9)	18

KUVIOT

Kuvio 1. Nitraatin kuvaaja spektrofotometrillä skannatusta näytteestä.	30
Kuvio 2. Nitriitin kuvaaja spektrofotometrillä skannatusta näytteestä.	31
Kuvio 3. Nitraatin mittausajan optimointi.	32
Kuvio 4. Nitriitin mittausajan optimointi.	32
Kuvio 5. Nitraatin ja nitriitin kalibrointisuorat.	34
Kuvio 6. Kalibrointisuorien residuaalikuvaajat.	35
Kuvio 7. Nitraatin ja nitraatin keskihajonnat pitoisuuden funktiona.	37
Kuvio 8. FIA-analysaattorilla ja valmisputkimenetelmillä saadut tulokset samoista näytteistä.	40

TAULUKOT

Taulukko 1. DR 2800 -spektrofotometrin suorituskyvyn spesifikaatioita. (10)	16
Taulukko 2. Lambda 12 -spektrofotometrin suorituskyvyn spesifikaatioita. (11)	17
Taulukko 3. Valmisputkisarjan LCK 339 näytekyvettien ja reagenssi A:n koostumukset. (12)	18
Taulukko 4. Reagenssipakkauksen LCK 541 reagenssien koostumukset. (13)	19
Taulukko 5. Nitraatin ja nitriitin kalibrointiliuosten pitoisuudet.	22
Taulukko 6. FIA-menetelmien ja valmisputkimenetelmien vertailu.	41

1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön toimeksiantajana oli Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy. Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy on yritys, joka tarjoaa tutkimus- ja asiantuntijapalveluja ensisijaisesti Lounais-Suomen vesiensuojeluyhdistyksen toimialueella. Yrityksen tuottamat tutkimustulokset ovat luotettavia ja niiden perusteella laaditut lausunnot ja tutkimusraportit ovat objektiivisia. Yrityksen omistaa Lounais-Suomen vesiensuojeluyhdistys ry, jonka tarkoituksena on edistää vesiensuojelua omalla toimialueellaan. (1)

Laboratorion laatujärjestelmä perustuu standardiin SFS-EN ISO/IEC 17025:2005 *Testaus- ja kalibrointilaboratorioiden pätevyys. Yleiset vaatimukset*. Laatujärjestelmän tulee jatkuvasti täyttää standardin asettamat laatuvaatimukset. Laatujärjestelmä koostuu laatukäsikirjasta, menettely- ja menetelmäohjeista sekä muista ohjeista ja rekistereistä. (1)

Laboratoriossa analysoidaan sekä puhtaita että jätevesiä. Jätevesistä on aikaisemmin analysoitu nitraattia ja nitriittiä FIA-analysaattorilla. Kyseinen menetelmä on spektrofotometrinen standardimenetelmä. Jäteveden nitraatti- ja nitriittimäärittämiä tulee analysoidavaksi suhteellisen vähän. Tietty tarkkailunäytteet tulevat kuitenkin analysoidavaksi päivittäin, ja usein laite joudutaan käynnistämään vain yhden näytteen takia. Tämä on koettu laboratorioissa työlääksi, ja tästä syystä haluttiin saada käyttöön ns. valmisputkimenetelmät, jotka ovat kustannuksiltaan hieman kalliimpia mutta huomattavasti yksinkertaisempia ja nopeampia käyttää. Laboratorioissa on jo käytössä useita Hach Langen valmisputkimenetelmiä, joista osa on käytössä päivittäin. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida Hach Langen valmisputkimenetelmät jäteveden nitraatin ja nitriitin määrittämiselle.

2 VESIHUOLTO

Vesihuollolla tarkoitetaan kokonaisuutta, joka käsittää vedenhankinnan, vedenjakelun, viemäröinnin ja jätevesien käsittelyn. Vesijohtovedeksi käsiteltävä raakavesi otetaan joko pohja- tai pintavedestä. Käytön jälkeen vesijohtovesi muuttuu jätevedeksi, joka kulkeutuu viemäriverkosta jätevedenpuhdistamolle ja sieltä puhdistuksen jälkeen takaisin vesistöön. Jätevedestä erottuu puhdistuksen aikana myös lietettä, joka käsitellään asianmukaisesti. Vesihuollon järjestäminen on kuntien vastuulla. Vesihuollon valvonnasta ja suunnittelun ohjauksesta taas vastaavat elinkeino-, liikenne- ja ympäristökeskukset. (2)

2.1 Velvoitetarkkailut

Kuntien jätevedenpuhdistamot ja sen lisäksi myös kaikki muut merkittävät vesien likaajat on vesilain ja ympäristönsuojelulain nojalla velvoitettu tarkkailemaan vesien tilaa. Toiminnot, joka aiheuttavat ympäristölle pilaantumisen vaaraa vaativat ympäristöluvan. Lupiin liittyy lähes aina tarkkailuvelvoitteita. Tarkkailuvelvoite voi koskea joko kuormituksen tarkkailua, ympäristövaikutusten seurantaa tai molempia. Velvoitetarkkailun tarkoituksena on selvittää toiminnan vesistövaikutukset. Tarkkailulle laaditaan suunnitelma, jossa määritellään havaintopaikkojen määrä, sijainti, tarkkailuajankohdat ja määrittymiset, joita näytteistä tulee kunakin ajankohtana tehdä. Määrittymiset pyritään valitsemaan siten, että ne kuvaavat parhaiten kyseisen alueen ongelmia. Velvoitetarkkailun toteutumista valvovat elinkeino-, liikenne- ja ympäristökeskukset. (2)

Tarkkailuja toteuttavat erilaiset vesitutkimuslaitokset, ja suurin osa näistä on akkreditoinut käyttämiään analyysimenetelmiä. Vesitutkimuslaitosten toimintaa valvotaan mm. pätevyyskokeilla, jotta voidaan osoittaa tulosten luotettavuus. Tarkkailuihin käytettävien menetelmien tulee olla standardisoituja tai muuten ympäristöhallinnon seurannoissa käyttämien menetelmien kanssa yhdenmukaisia. (2)

2.2 Jäteveden käsittely

Jätevesiä käsitellään, jotta saataisiin vesistöön joutuvien epäpuhtauksien määrä ja haitalliset vaikutukset mahdollisimman vähäisiksi. Purkuvesistölle on asetettu tavoitteet tarkkailusuunnitelmassa, ja vaadittava puhdistuksen taso riippuu tavoitteista. Jäteveden puhdistuksella pyritään poistamaan jätevedestä

- kiintoaines
- biologista hapenkulutusta aiheuttava aines
- ravinteet
- rasvat ja öljyt
- patogeeniset organismit
- myrkyt
- radioaktiiviset aineet
- pesu- ja puhdistusaineet

Seuraavat yksiköt muodostavat jäteveden käsittelysystemin:

- Välppäys, jossa erottuvat suuremmat roskat
- Rasvan ja hiekan erotus, jossa kuoritaan pinnalla kelluva rasva ja erotetaan hiekka altaassa, jossa on lyhyt viipymä
- Etuselkeytys, jossa erotetaan vettä raskaammat hiukkaset ja poistetaan laskeutunut aines eli raakaliete
- Ilmastus, jossa aktiiviliete eli elävä pieneliöstö käyttää ravintonaan orgaanista ainesta muuttaen sen hiilidioksidiksi ja vedeksi
- Jälkiselkeytys, jossa erotetaan vesi ja aktiiviliete laskeuttamalla. Aktiiviliete palautetaan ilmastusaltaaseen ja puhdistettu vesi lasketaan vesistöön.

Valtaosa Suomen asukkaista asuu asutuskeskuksissa, joiden jätevedet puhdistetaan biologis-kemiallisesti jätevedenpuhdistamoilla. Vuonna 2007 jätevedenpuhdistamoiden poistoteho oli keskimäärin 97 % orgaanisesta aineksesta, 96 % fosforista ja 56 % typestä. (2, 3)

3 TYPEN POISTO JÄTEVEDESTÄ

Jätevesissä esiintyvillä ravinteilla tarkoitetaan vesistöjä rehevöittäviä aineita, eli typpeä ja fosforia. Niiden poistaminen on erittäin tärkeä osa jäteveden puhdistusta juuri rehevöittävän vaikutuksen takia. Fosforin poistoon käytetään kemiallisia menetelmiä. Typpiyhdisteitä voidaan poistaa myös kemiallisesti, mutta koska typpiyhdisteet eivät muodosta saostuvia suoloja, typpiyhdisteiden poistoa kemiallisin menetelmin ei juuri käytetä. Typpeä voidaan poistaa myös fysikaalisesti, mutta Suomessa käytetään pääasiassa biologisia nitrifikaatioon ja denitrifikaatioon perustuvia menetelmiä. (2, 3)

3.1 Typen lähteet

Typpeä päätyy vesistöihin useasta eri lähteestä. Suurin osa typestä joutuu vesistöihin hajakuormituksen seurauksena. Hajakuormituksella tarkoitetaan maaja metsätaloutta sekä asutusta, joka on viemäriverkoston ulkopuolella. Maatalouden kuormituksen syynä ovat pääasiassa lannoitteet. Pistemäisten lähteiden, kuten yhdyskuntien ja teollisuuden, typpikuormitus on vähentynyt huomattavasti vuosien mittaan. Paikallisia haittoja kuitenkin on nähtävissä edelleen. (4)

Ilmasta tuleva laskeuma on yksi suuri typen lähde. Laskeuman merkitys korostuu varsinkin pienen kokonaiskuormituksen alueilla, koska se jakautuu muuta kuormitusta tasaisemmin. Myös sateilla on suuri merkitys typpikuormaan, koska sateiden mukana huuhtoutuu typpeä. Huuhtoutuva typpi on yleensä liuenneena nitraatti-muodossa. Lannoitteiden ravinteita päätyy vesistöön huuhtouman seurauksena. Lannoitteiden aiheuttamaa typpikuormaa on pyritty vähentämään, mutta se on hankalaa, koska huuhtoumaan vaikuttavat merkittävästi mm. maaperän laatu, maanpinnan muodot, maan happamuus, maan ionikoostumus sekä muut kemialliset seikat. (4)

3.2 Typen muodot jätevedessä

Typpi voi esiintyä jätevedessä useassa eri muodossa. Käsittelemättömässä jätevedessä typpi on enimmäkseen sitoutuneena orgaanisiin yhdisteisiin tai ammoniakkinä. Mitä enemmän jätevettä on hapetettu, sitä enemmän esiintyy nitraatteja ja vastaavasti vähemmän orgaanisia typpiyhdisteitä ja ammoniakkia. Typpiyhdisteiden olomuodot muuttuvat mahdollisesti useaan kertaan jäteveden käsittelyprosessin aikana. Muutoksista tärkein on ammoniumtypen muuttuminen sellaiseen muotoon, jossa se on helposti poistettavissa jätevedestä. (3)

Ammoniakki on typen ja vedyn yhdiste. Normaaliolosuhteissa se on kaasumaisessa muodossa. Ammoniakki liukenee veteen erittäin helposti ja esiintyy vedessä yleensä ammonium-ionina. Ammoniakki on ensimmäinen epäorgaaninen vaihe typpipitoisten orgaanisten yhdisteiden biologisessa hajoamisessa, joten sitä esiintyy runsaasti jätevesissä, jotka ovat mätänemisvaiheessa. Vesistössä ammoniakki on hyvä indikaattori jätevesikontaminaatiosta (5, 6)

Nitriitti on typpihapokkeen suola. Se on jäteaineiden hajoamisprosessissa ammoniakista seuraava ja nitraattia edeltävä typen muoto. Luonnossa ammoniakista syntyvä nitriitti yleensä hapettuu varsin nopeasti nitraatiksi. (5)

Nitraatti on typpihapon suola. Nitraatti on jäteveden typpiyhdisteistä pisimmälle hajonnut muoto. Typeä ei yleensä ole jätevedessä nitraattimuodossa, mutta se muuttuu sellaiseksi, kun jäteaineet hajoavat biologisessa prosessissa. (5)

Kokonaistyyppi sisältää kaikki typen muodot. Sen määrällä on merkitystä jätevesien vaikutuksien arvioimisessa, koska typpi on fosforin ohella vesistön rehevöitymisen kannalta ratkaisevasti vaikuttava ravinne. (5)

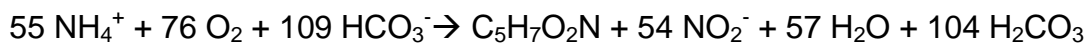
3.3 Nitrifikaatio-denitrifikaatio

Nitrifikaatio-denitrifikaatio -prosessissa typen poisto tapahtuu kahdessa eri vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa jätevedessä olevat pelkistyneet typpiyhdisteet, kuten ammoniakki ja virtsa-aine, hapetetaan nitriitin kautta nitraatiksi. Toi-

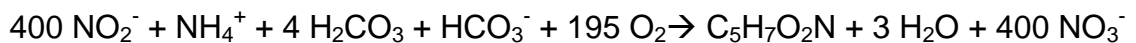
sessä vaiheessa nitraatti pelkistetään denitrifikaatiobakteerien avulla typpikaasuksi, joka haihtuu ilmaan. Nämä kaksi prosessia yhdistämällä voidaan saavuttaa 60 – 90 prosentin typen poisto. (2, 3)

3.3.1 Nitrifikaatio

Nitrifikaatiossa ammoniumtyppi hapettuu nitraattitypeksi kaksivaiheisessa reaktiossa. Ensimmäisessä vaiheessa bakteerit hapettavat ammoniumtypen nitriitiksi. Hapettamiseen käytetään joko *Nitrosomonas*-, *Nitrospira*- tai *Nitrobacter*-suvun bakteereja. Hapetusreaktion reaktioyhtälö:



Nitrifikaatiobakteerit tarvitsevat kasvuunsa happea, karbonaattia ja ammoniumioneja. Nitrifikaatio-reaktion nopeutta rajoittava tekijä on nitriitin syntyminen. Nitriitti on pysymätön väliaine, ja toisessa vaiheessa nitriitti hapetetaan nitraatiksi *Nitro*-bakteerien avulla:



Bakteerit, jotka aikaansaavat nitrifikaation, ovat herkkiä inhibiittoreille. Sen lisäksi jätevesissä voi olla yhdisteitä, jotka estävät hapetusreaktion. Tällaisia yhdisteitä tulee varsinkin teollisuudesta. Nitrifikaatioprosessi on myös riippuvainen lämpötilasta, ja alhainen lämpötila voi äärimmillään jopa estää nitrifikaation. Optimaalinen lämpötila nitrifikaatioprosessille on 30 – 35 °C. pH-optimi nitrifikaatiolle on 7 – 8,5. Jos pH laskee alle 6,5:n, reaktio hidastuu huomattavasti. (3, 7)

3.3.2 Denitrifikaatio

Typen poiston toisessa vaiheessa, denitrifikaatiossa, nitraatti pelkistetään typpikaasuksi. Denitrifikaatio tapahtuu olosuhteissa, joissa happea on vähän. Hapen määrällä on merkitystä, koska happi inhiboi denitrifikaatioon tarvittavia entsyymejä, eivätkä bakteerit tällöin pelkistä nitraattia. Denitrifikaatiossa voidaan käyttää useita eri bakteerisukuja, kuten *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*,

Basillus, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobasillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* ja *Spirillum*. Denitrifikaatiobakteerit ovat heterotrofisia, eli ne tarvitsevat ulkopuolisen hiilenlähteen. Nitraatti muuttuu denitrifikaatiossa typpi-kaasuksi asteittain:



Denitrifikaatioprosessissa tarvittava orgaaninen aine voi olla peräisin jätevedestä itsestään, mutta käytännössä orgaaninen aine on yleensä poistunut jätevedestä jo ennen denitrifikaatio-vaihetta. Orgaaninen aine voi olla myös peräisin ulkopuolelta, kuten käsittelemättömästä jätevedestä tai hydrolysoidusta lietteestä. (3, 7)

4 MENETELMÄT, LAITTEET JA VÄLINEET

4.1 Nitraatin ja nitriitin määrittäminen FIA-tekniikalla

Nitraatin ja nitriitin määrittäminen FIA-tekniikalla perustuu standardiin SFS-EN ISO 13395:1997. FIA-menetelmässä näyte annostellaan suoraan virtaavaan kantajaliuokseen. Näytteessä olevat analysoitavat komponentit reagoivat reagenssiliuosten kanssa samalla, kun kulkevat reaktioyksikön läpi. Reaktion jälkeen määritettävä ioni voidaan mitata fotometrisesti virtausdetektorilla. Näytteen syöttö tapahtuu injektioventtiilin kautta kantajavirtaan. Menetelmällä voidaan määrittää joko nitraattityppi, nitriittityppi, tai niiden summa. (8)

Nitraatti- ja nitriittityypen summa määritetään pelkistämällä näytteessä oleva nitraatti nitriitiksi kuparilla päällystetyn kadmiumpylvään avulla. Tämän jälkeen näytteeseen lisätään jatkuvana virtana happoliuosta, jolloin liuoksen pH laskee 1,5 – 2,0:een. Happamassa liuoksessa nitriitti reagoi sulfaniiliamidin kanssa muodostaen diatsosuoloja, joka edelleen reagoi aromaattisen amiinin kanssa, jolloin muodostuu punaista väriainetta. Väriaineen absorbanssi mitataan aallonpituudella 540 nm. (8)

Nitriittityypen määrittäminen tapahtuu samalla tavalla mutta ilman kadmiumpelkistystä. Nitraattityppi saadaan määritettyä laskennallisesti, kun on ensin määritetty nitriittityppi sekä nitraatti- ja nitriittityypen summa. (8)

4.2 Nitraatin ja nitriitin määrittäminen Hach Langen valmisputkimenetelmällä

Nitraatin määrittäminen Hach Langen valmisputkimenetelmällä LCK 339 perustuu standardiin DIN 38405 D9-1. Näytteessä oleva nitraatti reagoi 2,6-dimetyylifenolin kanssa muodostaen 4-nitro-2,6-dimetyylifenolia liuoksessa, joka sisältää rikki- ja fosforihappoa. Reaktion jälkeen liuoksen absorbanssi mitataan aallonpituudella 345 nm. (9)

Nitriitin määrittäminen Hach Langen valmisputkimenetelmällä LCK 541 perustuu standardiin DIN EN 26777. Näytteessä oleva nitriitti reagoi happamassa liuoksessa primääristen aromaattisten amiinien kanssa muodostaen diatsoniumsuoloja. Nämä diatsoniumsuolat yhdistyvät amino- tai hydroksyyli-ryhmän sisältävien aromaattisten yhdisteiden kanssa. Reaktiosta muodostuu voimakkaan värinen atsoväriaine, jonka absorbanssi mitataan aallonpituudella 515 nm. (9)

4.3 Spektrofotometri Hach Lange DR 2800

Määrittämissä käytettiin Hach Langen DR 2800 -spektrofotometriä, joka on kuvassa 1. DR 2800 on VIS-spektrofotometri, jonka mittausalue on 340 - 900 nm. DR 2800:lle on ohjelmoitu jo tehtaalla valmiita mittausohjelmia. Mittauksissa voidaan käyttää näitä valmiita ohjelmia, luoda ja tallentaa omia ohjelmia tai mitata näytteitä manuaalisesti yhdellä tai useammalla aallonpituudella.



Kuva 1. DR 2800 -Spektrofotometri. (10)

Spektrofotometri suorittaa käynnistyksen yhteydessä automaattisesti sarjan testejä, joilla varmistetaan systeemin toimivuus. Jos laite havaitsee testeissä poikkeamia, tulee näyttöön automaattisesti ilmoitus, jossa käsketään suorittamaan täydellinen systeemin testaus. Spektrofotometrin suorituskyvyn spesifikaatioita on lueteltu taulukossa 1.

Taulukko 1. DR 2800 -spektrofotometrin suorituskyvyn spesifikaatioita. (10)

Parametri	Spektrofotometrin suorituskyyky
Aallonpituuden tarkkuus	$\pm 1,5$ nm
Aallonpituuden resoluutio	1 nm
Aallonpituuden toistettavuus	$<0,1$ nm
Fotometrinen tarkkuus	alueella 0-0,5 Abs: 5mAbs alueella 0,5-2,0 Abs: 1 %
Fotometrinen lineaarisuus (mitattu aallonpituudella 546 nm)	alueella 0-2 Abs $<0,5$ % alueella >2 Abs 1 %
Lamppu	kaasutäyteinen tungsten

Spektrofotometrissä voidaan käyttää erikokoisia kyvettejä. Kyvettiaukkoja spektrofotometrissä löytyy kaksi. Isompaan kyvettiaukkoon on saavana myös erilaisia adaptereita. Spektrofotometrin kyvettiaukot ovat kuvassa 2.



Kuva 2. DR 2800 -spektrofotometrin kyvettiaukot. (10)

Kyvettiaukko 1 on tarkoitettu valmisputkipakkauksien kyveteille, joiden halkaisija on 1,3 cm. Hach Langen valmisputkipakkauksien kyveteissä on viivakoodit, joiden perusteella spektrofotometri valitsee valmiin mittausohjelman, mittaa näytteen ja antaa tuloksen käyttäjän valinnan mukaan joko absorbanssina, transmitanssina tai konsentraatioyksikkönä. Kyvettiaukkoa 2 käytetään manuaalimitta-

uksiin 5 cm kyvetillä, jossa ei ole viivakoodia. Määrityksistä nitraatti mitataan valmisputkipakkauksen valmiilla kyvetillä, jossa on viivakoodi. Nitriitin määritykseen käytetään 5 cm kyvettä.

4.4 Spektrofotometri Perkin Elmer Lambda 12

Mittausajan optimoinnissa ja aallonpituusmaksimin määrityksessä käytettiin Perkin Elmerin Lambda 12 -spektrofotometriä. Lambda 12 on UV/VIS-spektrofotometri, jonka mittausalue on 190 - 1100 nm. Laitteistoon kuuluu spektrofotometrin lisäksi läpivirtausyksikkö. Spektrofotometrin suorituskyvyn spesifikaatioita on lueteltu taulukossa 2.

Taulukko 2. Lambda 12 -spektrofotometrin suorituskyvyn spesifikaatioita. (11)

Parametri	Spektrofotometrin suorituskky
Aallonpituuden tarkkuus	$\pm 0,1$ nm
Aallonpituuden toistettavuus	$\pm 0,1$ nm
Fotometrinen tarkkuus	$\pm 0,003$ A
Fotometrinen toistettavuus	$\pm 0,001$ A
Lamppu	Deuterium- tai tungsten-halogeneeni

Spektrofotometrin toimintaa ohjataan tietokoneella ohjelmistolla UV Winlab Ver. 2.85.04. Läpivirtausyksikköön voidaan asettaa erikokoisia kyvettejä. Tässä työssä käytettiin 1 cm läpivirtauskyvettä.

4.5 Valmisputkipakkaukset

Validoitavana olevat valmisputkipakkaukset olivat Hach Langen kyvettitestejä. Pakkaukset sisältävät kaiken analysointiin tarvittavan kyveteistä reagensseihin. Nitraatin määrittystä varten valittiin kyvettitesti LCK 339. Nitriitin määritykseen valittiin reagenssipakkaus LCK 541 sekä siihen tarvittavat erilliset 5 cm kyvetit LKP 341. Kyvettitestit ja kyvetit ovat kuvassa 3.



Kuva 3. Hach Langen kyvettitestit ja kyvetit. (9)

4.5.1 LCK 339

Nitraatin kyvettitestiin LCK 339 sisältyy näytekyvetti sekä reagenssi A. Näytekyvetin sisällä on valmis reagenssiseos, johon näyte pipetoidaan. Näytekyvetin reagenssiseoksen ja reagenssi A:n koostumukset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Valmisputkisarjan LCK 339 näytekyvettien ja reagenssi A:n koostumukset. (12)

	Reagenssi	Pitoisuus %
Näytekyvetti	Rikkihappo	50 - 60
	Fosforihappo	25 - 33
	vesi	>7
Reagenssi A	vesi	>75
	isopropanoli	>20
	2,6-ksylenoli	<1
	isopentyyliasetaatti	<1

Valmisputkipakkauksen mukana tulevan analysointiohjeen mukaisesti putkeen pipetoidaan 1 ml näyteliuosta, lisätään 0,2 ml reagenssia A ja sekoitetaan. Mittaus voidaan suorittaa 15 min kuluttua. (12) Kyvettitestin analysointiohje on liitteessä 1.

4.5.2 LCK 541 ja LZP 341

Nitriitin määrittämiseen tarkoitettu reagenssipakkaus LCK 541 ei sisällä näytekyvettejä, vaan kyvetit ovat erillisenä pakkauksena LZP 341. Analysointiin käytetään muovisia kyvettejä, joiden läpimitta on 5 cm. Reagenssipakkaukseen sisältyy reagenssit A ja B, joiden koostumukset on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Reagenssipakkauksen LCK 541 reagenssien koostumukset. (13)

	Reagenssi	Pitoisuus %
Reagenssi A	D(-)-Mannitoli	>70
	Dextraani	<20
	Natriumhydroksidi	<0,1
Reagenssi B	vesi	<80
	sitruunahappo monohydraatti	<20
	di-natriumvetyfosfaatti	<5
	4-aminobentseenisulfonihappo	<0,5

Reagenssipakkauksen analysointiohjeen mukaisesti 5 cm:n kyvetiin lisätään yksi pelletti reagenssi A:ta, 0,5 ml reagenssia B, ja 5 ml näyteliuosta. Kyvetiä sekoitetaan kääntelemällä sitä ylösalaisin, kunnes reagenssipelletti A on kokonaan liennut. Mittaus voidaan suorittaa 10 min kuluttua. (13) Reagenssipakkauksen analysointiohje on liitteessä 2.

5 VALIDOINTI

Työn tarkoituksena oli validoida nitraatin ja nitriitin valmisputkimenetelmät. Validointi suoritettiin yrityksen käytännön mukaisesti. Validoitavana oli kaksi valmista menetelmää, joista molemmat perustuvat standardiin. Validoinnissa määritettiin menetelmien

- lineaarisuus
- määrittäysraja
- systemaattinen virhe
- satunnaisvirhe
- tarkkuus
- mittausepävarmuus
- aallonpituusmaksimi
- optimimittausaika

Lisäksi tutkittiin näyteliuoksen stabiilisuutta sekä lämpötilan vaikutusta analyysitulokseen. Molemmissa menetelmissä on yhdisteitä, jotka häiritsevät määrittäystä. Vanhassa menetelmässä häiritsevät yhdisteet sakataan pois. Uusilla menetelmillä kokeiltiin myös, näytteen käsittelyn vaikutusta lopputulokseen. Lopuksi validoituja menetelmiä verrattiin käytössä oleviin menetelmiin. Validoinnin vaatimuksena oli, että valmisputkimenetelmän tulee olla yhtä hyvä kuin vanha menetelmä. Lisäksi valmisputkimenetelmän tulee täyttää valmistajan lupaukset. Validoinnin suorittamisessa käytettiin tunnettuja referenssimateriaaleja, itse valmistettuja kontrolliliuoksia, joiden pitoisuus tunnettiin, sekä todellisia näytteitä.

5.1 Aallonpituusmaksimi ja mittausaika

Työssä lähdettiin liikkeelle valmistajan antamista analysointiohjeista ja parametreista. Ensimmäiseksi haluttiin tarkistaa, ovatko valmistajan antamat aallonpituusmaksimi ja mittausaika parhaat mahdolliset analyysin kannalta. Aallonpi-

tuusmaksimiin ja mittausajan optimointiin käytettiin itse valmistettuja kontrolliliuoksia. Mittaukset suoritettiin Perkin Elmerin spektrofotometrillä Lambda 12.

Aallonpituusmaksimia varten näyte käsiteltiin valmistajan analysointiohjeen mukaisesti, ja reaktioajan kuluttua näyte skannattiin spektrofotometrillä aallonpituusalueella 190 - 900 nm. Mittausajan optimointia varten näyte käsiteltiin valmistajan analysointiohjeen mukaisesti, ja heti reaktion alkaessa näytettä alettiin mitata valmistajan antamalla mittausaallonpituudella 1 min välein. Mittauksia jatkettiin 1 h ajan.

5.2 Lineaarisuus

Lineaarisuus mittaa sitä, miten hyvin laitteen antaman vasteen ja analyytin konsentraation muodostama kuvaaja vastaa suoraa viivaa. Analyyttisen menetelmän lineaarinen alue on se konsentraatioalue, jonka antama vaste on verrannollinen konsentraatioon hyväksytyllä tarkkuudella. (16) Lineaarisuuden määrittäminen on tarpeen kvantitatiivisille menetelmille, koska sillä saadaan selvitettyä pitoisuusalue, jossa menetelmä on käyttökelpoinen. Lineaarisen alueen rajoittavina tekijöinä ovat mittausalueen alkupäässä toteamis- ja määritysraja, ja mittausalueen loppupäässä mittalaitteen detektio-ominaisuudet. Mittausalueella voi olla myös useita lineaarisuusalueita. (14)

Kun arvioidaan lineaarisuutta, pyritään määrittäessä saadun pistejoukon sovittamisessa aina ensisijaisesti käyttämään ensimmäisen asteen yhtälöä. Aina tämä ei kuitenkaan sovellu tutkittavaan pistejoukkoon. Tällöin voidaan kokeilla vastearvon muuntamista logaritmilla, neliöjuurella, tai sovittaa pistejoukkoon toisen tai korkeamman asteen yhtälö. (14)

Lineaarisuus määritettiin mittaamalla 6 eri liuosta, joiden pitoisuus oli valmistajan ilmoittamalta määritysalueelta. Lisäksi mitattiin nollanäyte. Nollanäytteenä käytettiin MQ-vettä. Jokaisesta pitoisuudesta mitattiin kaksi rinnakkaista näytettä. Näyteliuoksena käytettiin referenssimateriaalia, jonka pitoisuus on tunnettu.

Nitraatti-menetelmässä referenssimateriaalina toimi Merckin NO₃-standardiliuos, jonka nitraattipitoisuus on 225,9 mg/l. Referenssimateriaalista laimennettiin liuokset, joiden pitoisuudet ovat taulukossa 5.

Nitriitti-menetelmässä referenssimateriaalina toimi Acculon™ NO₂-Reference Standard, jonka nitriittipitoisuus on 30,45 mg/l. Referenssimateriaalista laimennettiin liuokset, joiden pitoisuudet ovat taulukossa 5.

Taulukko 5. Nitraatin ja nitriitin kalibrointiliuosten pitoisuudet.

Kalibrointiliuos	NO ₃ mg/l	NO ₂ mg/l
1	0	0
2	0,54	0,0015
3	2,7	0,006
4	5,4	0,012
5	8,1	0,018
6	10,8	0,024
7	13,5	0,030

Mittaustulosten perusteella piirrettiin kuvaajat absorbanssille pitoisuuden funktiona, jonka perusteella arvioitiin kalibroinnin lineaarisuutta. Lineaarisen mallin soveltuvuutta kalibrointiin arvioitiin piirtämällä kuvaajat residuaaleille pitoisuuden funktiona. Residuaalien (ε) laskemiseen käytettiin kaavaa 1.

$$\varepsilon = y_i - \hat{y}_i \quad (1)$$

y_i = mitattu y -arvo

\hat{y}_i = regressiosuoralta laskettu y -arvo

5.3 Määritysraja

Määritysrajalla tarkoitetaan sitä pitoisuutta, joka voidaan määrittää hyväksyttävällä tarkkuudella ja täsmällisyydellä. Määritysrajan toteamiseen käytetään so-

pivaa näytettä tai standardia. Kun määrittäysraja on määritetty, voidaan valitulla tilastolla todennäköisyydellä sanoa näytteessä olevan pitoisuuden eron nolasta olevan merkitsevä. (14)

Yleensä määrittäysrajan määrittämiseen valitaan matriisiltaan mahdollisimman samanlainen näyte kuin määritettävä näyte. Määrittäykseen voidaan kuitenkin käyttää myös nollanäytettä, mikäli nollanäyte antaa riittävän mittasignaalin. (14)

Määrittäysrajan määrittämiseksi mitattiin nollanäytteitä useana eri päivänä. Jokaisena analysointipäivänä mitattiin kaksi rinnakkaista näytettä. Nollanäytteenä käytettiin MQ-vettä. Nollanäytteistä saaduista tuloksista laskettiin keskihajonta, jonka perusteella laskettiin määrittäysraja kaavalla 2.

$$\text{määrittäysraja} = \mu_B + 10 * s \quad (2)$$

μ_B = nollanäytteiden tulosten keskiarvo

s = nollanäytteiden tulosten keskihajonta

5.4 Systemaattinen virhe

Systemaattinen virhe määritetään, jotta nähtäisiin, miten tarkkoja ja todellisia tuloksia menetelmällä saadaan. Jos määrittäyksestä saadaan jatkuvasti pienempi tai suurempi tulos kuin todellinen arvo, on määrittäyksessä systemaattista virhettä. Virhe (β) voidaan laskea kaavalla 3. Systemaattiseen virheeseen vaikuttavat mm. kalibrointi, nollanäytteen virheellinen arviointi, näytteessä olevat analyytin muodot joita laite ei kykene detektoimaan, määrittäysolosuhteet ja näytteen mahdollinen muuttuminen. (14)

$$\beta = X - \mu \quad (3)$$

X = määrittämällä saatu tulos

μ = todellinen arvo

Systemaattista virhettä voidaan arvioida ns. standardinlisäysmenetelmällä, jossa näytteeseen lisätään tunnettu määrä standardia, jonka pitoisuus tunnetaan.

Tällä menetelmällä saadaan selville, onko tutkittavassa näytteessä yhdisteitä, jotka häiritsevät määrittystä. (14)

Systemaattisen virheen arviointi toteutettiin saantokokeella, jossa todelliseen näytteeseen lisättiin tunnettu määrä standardiliuosta. Saantokoetta varten tehtiin kymmenen rinnakkaista määrittystä. Lisäksi mitattiin pelkkä todellinen näyte ilman standardilisäystä.

Nitraatin määrittämisessä standardiliuoksena käytettiin Merckin NO_3^- -referenssistandardia, jonka nitraattipitoisuus on 225,9 mg/l. Standardiliuosta pipetoitiin 2,259 mg:aa vastaava määrä 100 ml:n mittapulloon ja täytettiin merkkiin kunnallisen jätevedenpuhdistamon jätevedellä.

Nitriitin määrittämisessä standardiliuoksena käytettiin Merckin NO_2^- -referenssistandardia, jonka pitoisuus on 30,45 mg/l. Standardiliuosta pipetoitiin 0,0076 mg:aa vastaava määrä 1000 ml:n mittapulloon ja täytettiin merkkiin kunnallisen jätevedenpuhdistamon jätevedellä. Saanto (R) laskettiin kaavalla 4.

$$R = \frac{(S-U) \cdot 100\%}{C} \quad (4)$$

C = lisätyn standardiliuoksen pitoisuus

U = näytteen alkuperäinen pitoisuus

S = lisäyksen sisältävän näytteen pitoisuus

5.5 Satunnaisvirhe

Satunnaisvirhettä aiheutuu määrittämisessä sarjan sisäisestä vaihtelusta ja vaihtelusta sarjojen välillä. Satunnaisvirheen arvioinnissa sarjojen lukumäärä riippuukin siitä, kummasta virhelähteestä satunnaisvirheen oletetaan johtuvan. Jos oletuksena on, että satunnaisvirhettä aiheutuu sarjojen välisestä vaihtelusta, määrittysten lukumäärä sarjassa valitaan pieneksi ja sarjojen lukumäärä suureksi. Jos taas virheen oletetaan johtuvan sarjan sisäisestä vaihtelusta, vähennetään sarjojen määrää ja kasvatetaan määrittysten lukumäärää sarjassa. (14)

Määrittäksessä käytettävien näytteiden tulee olla homogeenisia. Määrittäykseen voidaan käyttää useita erilaisia näytetyyppejä, esim. standardiliuosta, nollanäytteitä tai näytteitä, joihin on lisätty tunnettu määrä määritettävää yhdistettä. (14)

Satunnaisvirhettä arvioitiin mittaamalla useana eri päivänä todellisia jätevesinäytteitä. Jokaisesta näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaista määrittystä. Rinnakkaisten tulosten keskiarvoista laskettiin suhteelliset keskihajonnat. Suhteellisista keskihajonnoista piirrettiin kuvaaja pitoisuuden funktiona, jonka perusteella arvioitiin, onko suhteellinen keskihajonta riippuvainen pitoisuudesta. Tämän jälkeen suhteellisen keskihajonnat yhdistettiin kaavalla 5 ja laskettuun satunnaisvirheen luottamusväli 95 % todennäköisyydellä kaavalla 6.

$$s_r = \sqrt{\frac{1}{n} \sum s_{ri}^2} \quad (5)$$

s_r = yhdistetty suhteellinen keskihajonta

$$\text{Satunnaisvirheen luottamusväli} = \pm t_{0,05} * s_r \quad (6)$$

5.6 Tarkkuus

Tarkkuudella tarkoitetaan tulosten keskiarvon yhtäpitävyyttä todellisen tai hyväksytyn arvon kanssa. Tarkkuudesta puhutaan silloin, kun menetelmällä pyritään saamaan näytteistä todellisia pitoisuuksia, tai kun halutaan verrata tuloksia muiden laboratorioden tulosten kanssa. Systemaattinen virhe ja satunnaisvirhe vaikuttavat tarkkuuteen. Tarkkuus voidaan määrittää mittaamalla näytteitä, joiden todellinen pitoisuus tunnetaan. Menetelmän tarkkuutta voidaan arvioida myös osallistumalla vertailukokeisiin tai vertaamalla tuloksia toisella menetelmällä saatuihin tuloksiin. (14)

Tarkkuuden määrittystä varten analysoitiin useana eri päivänä referenssimateriaalia, jonka pitoisuus tunnetaan tarkasti. Nitraattimenetelmän tarkkuuden määrittäksessä käytettiin laboratorioden välisissä vertailukokeissa käytettyä referens-

sistandardia, jonka pitoisuus on $4,96 \pm 0,06$ mg 99 % luottamusvälillä. Nitriittimenetelmän tarkkuuden määrittämisessä käytettiin Merckin NO_2 -referenssistandardia, jonka nitriittipitoisuus on 30,45 mg/l. Nitraatin referenssistandardia käytettiin sellaisenaan. Nitriitin referenssistandardista laimennettiin päivittäin käyttöliuos, jonka pitoisuus oli 15,23 µg/l. Tällöin molempien menetelmien tarkkuus määritettiin pitoisuudella, joka oli mittausalueen keskivaiheilla. Referenssimateriaalin analysoinnin tuloksista laskettiin tarkkuus poikkeamana todellisesta arvosta kaavalla 7. Sen jälkeen arvioitiin t-testin avulla kaavalla 8, poikkeako keskiarvo merkitsevästi ilmoitetusta arvosta 95 % luottamusvälillä.

$$\text{Tarkkuus} - \% = \frac{100 \cdot (X - \mu)}{\mu} \quad (7)$$

μ = todellinen arvo

X = määrittämällä saatu arvo

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad (8)$$

\bar{x} = tulosten keskiarvo

μ = vertailumateriaalille ilmoitettu arvo

s = tulosten keskihajonta

5.7 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on arvio rajoista, joiden välissä todellinen arvo on valitulla todennäköisyydellä. Mittausepävarmuus saadaan laskettua testaustuloksien perusteella. Menetelmän mittausepävarmuus riippuu analysoitavien näytteiden matriisista ja pitoisuustasosta. Arvio mittausepävarmuudesta voidaan tehdä tunnetuilla näytteillä mutta myös silloin, kun oikeaa pitoisuutta ei tunneta. Mittausepävarmuus on tärkeä tieto kvantitatiivisten tulosten yhteydessä, sillä sen

perusteella voidaan tehdä johtopäätöksiä tuloksista ja niiden luotettavuudesta sekä verrata tuloksia keskenään. (14)

Mittausepävarmuus määritettiin laskemalla systemaattisen virheen ja satunnaisvirheen suhteellisista keskihajonnoista kokonaisepävarmuus u_c kaavalla 9. Kokonaisepävarmuudesta laskettiin vielä laajennettu epävarmuus U kaavalla 10. Laajennettu epävarmuus vastaa 95 % luottamusväliä.

$$u_c = \sqrt{\sum u_i^2} \quad (9)$$

u_i = yksittäinen epävarmuustekijä

$$U = 2 * u_c \quad (10)$$

5.8 Näyteliuoksen stabiilisuus

Näyteliuoksen stabiilisuus haluttiin tutkia, koska valmistajan analyysiohjeessa neuvottiin, että mittaus tulisi suorittaa viimeistään kolmen tunnin kuluttua näytteenotosta. Tämä olisi kuitenkin vaikeata toteuttaa käytännössä, koska näytteet saapuvat usein laboratorioon vasta iltopäivällä.

Näyteliuoksen stabiilisuutta tutkittiin mittaamalla samasta näyteliuoksesta nitraatti-/nitriittipitoisuus 3 h, 6 h, 24 h ja 72 h kuluttua näytteenotosta. Näyte säilytettiin mittausten välillä jääkaapissa.

5.9 Lämpötilan vaikutus

Lämpötilan vaikutus analyysituloksiin haluttiin tutkia, koska valmistajan analyysiohjeessa nitraatin analysointilämpötilaksi ilmoitettiin 20 - 24 °C. Näytteet ovat laboratorioon saapuessaan yleensä kylmiä, ja jos lämpötilalla on vaikutusta tuloksiin, tämä tulee huomioida analysoinnissa esim. näytteiden esilämmityksellä. Nitriitin analysointilämpötilaksi ilmoitettiin 15 - 25 °C, mutta lämpötilan vaikutus tutkittiin siitä huolimatta myös nitriitin analysoinnissa.

Lämpötilan vaikutuksen tutkimista varten temperoitiin näytteet jääkaappilämpötilaan, huoneen lämpötilaan ja +25 °C:een. Temperoinnin jälkeen näytteistä mitattiin tarkka lämpötila juuri ennen analysointia, ja sen jälkeen analysoitiin näyte ohjeen mukaisesti.

5.10 Näytteen käsittelyn vaikutus

Jätevesinäytteissä on usein yhdisteitä, jotka häiritsevät nitraatin ja nitriitin analysointia. Vanhassa menetelmässä näytteet esikäsitellään saostamalla häiritsevät yhdisteet lisäämällä 0,2 ml 2 mol/l magnesiumsulfaattiliuosta ja 0,2 ml 4 mol/l natriumhydroksidiliuosta 100 ml:aan näytettä. Näytteiden annetaan seistä 15 min, jonka jälkeen ne sentrifugoidaan 15 min ajan 3000 kierrosta/min. (15)

Näytteenkäsittelyn vaikutusta haluttiin kokeilla myös uudella menetelmällä. Samasta näytteestä määritettiin nitraatti- ja nitriittipitoisuus kolmella eri tavalla: ilman esikäsitelyä, sentrifugoimalla näyte 15 min 3000 kierrosta/min ja käsittelemällä näyte kuten vanhalla menetelmällä.

5.11 Menetelmävertailu

Validoinnin jälkeen uudella menetelmällä saatuja tuloksia tulee verrata vanhalla menetelmällä saatuihin tuloksiin, jotta nähdään, onko menetelmällä merkitystä tulostason kannalta. Jotta uusi menetelmä voitaisiin ottaa käyttöön, tulee voida osoittaa, etteivät sillä saadut tulokset eroa merkittävästi vanhalla menetelmällä saaduista tuloksista.

Menetelmien vertailua varten määritettiin useana eri päivänä todellisia näytteitä molemmilla menetelmillä. Uudella ja vanhalla menetelmällä saaduista tuloksista laskettiin tulosparien erotus ja keskiarvo. Varianssi laskettiin kaavan 11 mukaisesti. Sen jälkeen uuden ja vanhan menetelmän tuloksia verrattiin *t*-testin avulla kaavan 12 mukaan.

$$s_d^2 = \frac{\sum d_i^2 - (\sum d_i)^2 / n}{n-1} \quad (11)$$

$s_d^2 = \text{varianssi}$

$d_i = \text{tulosparien erotus}$

$n = \text{tulosparien lukumäärä}$

$$t = \frac{\bar{d}}{\sqrt{s_d^2/n}} \quad (12)$$

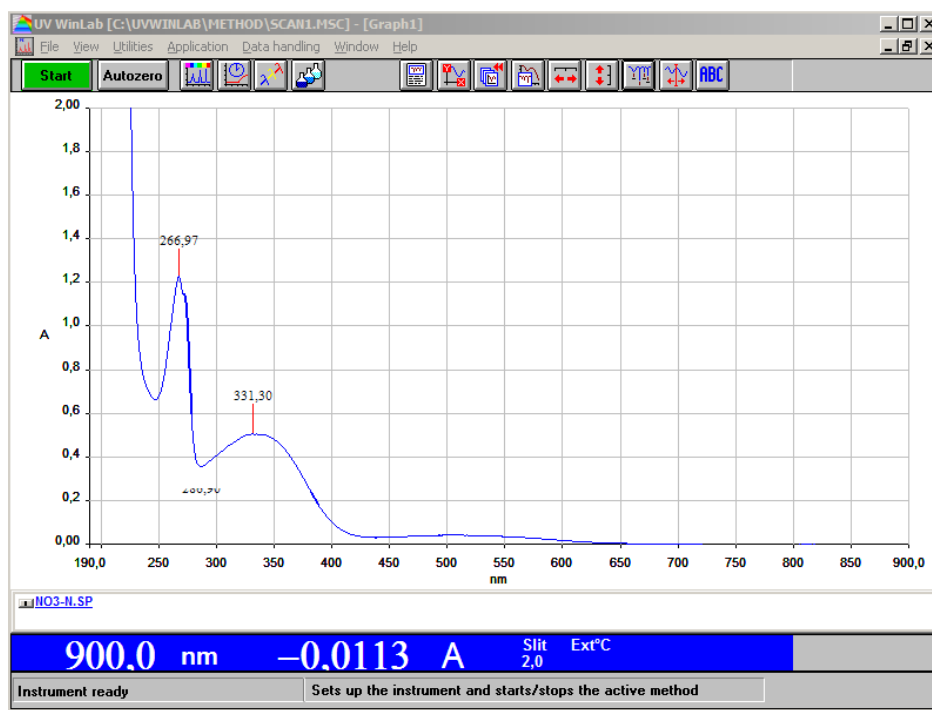
$\bar{d} = \text{tulosparien erotusten keskiarvo}$

6 TULOKSET

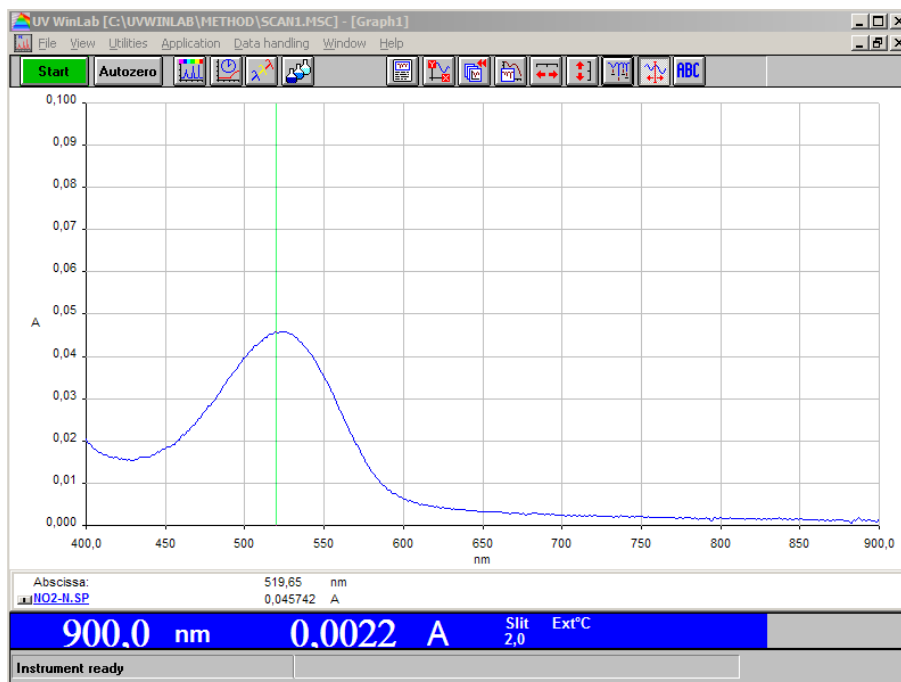
Validointinäytteitä mitattiin kahden kuukauden ajan. Validointi sujui suunnitelmi-
en mukaisesti ja mittaukset toteutettiin valmisputkipakkauksissa olevien ana-
lysointiohjeiden mukaisesti. Jokaisessa määrittysarjassa mitattiin laboratorion
käytännön mukaisesti myös nolla- ja kontrollinäytteet. Kontrollinäytteinä käytet-
tiin itse valmistettuja liuoksia, joista nitraattiliuoksen pitoisuus oli 4,85 mg/l ja
nitriittiliuoksen pitoisuus 0,020 mg/l. Kontrolliliuokset valmistettiin päivittäin. Va-
lidoinnin aikana mitattujen näytteiden tulokset ovat taulukoituna liitteessä 3.

6.1 Aallonpituusmaksimi ja mittausaika

Valmistaja oli ilmoittanut mittausaallonpituuksiksi nitraatille 345 nm ja nitriitille
515 nm. Spektrofotometrillä skannatusta näytteestä saatiin nitraatille spektri,
joka on kuviossa 1. Nitriittinäytteen spektri on kuviossa 2.



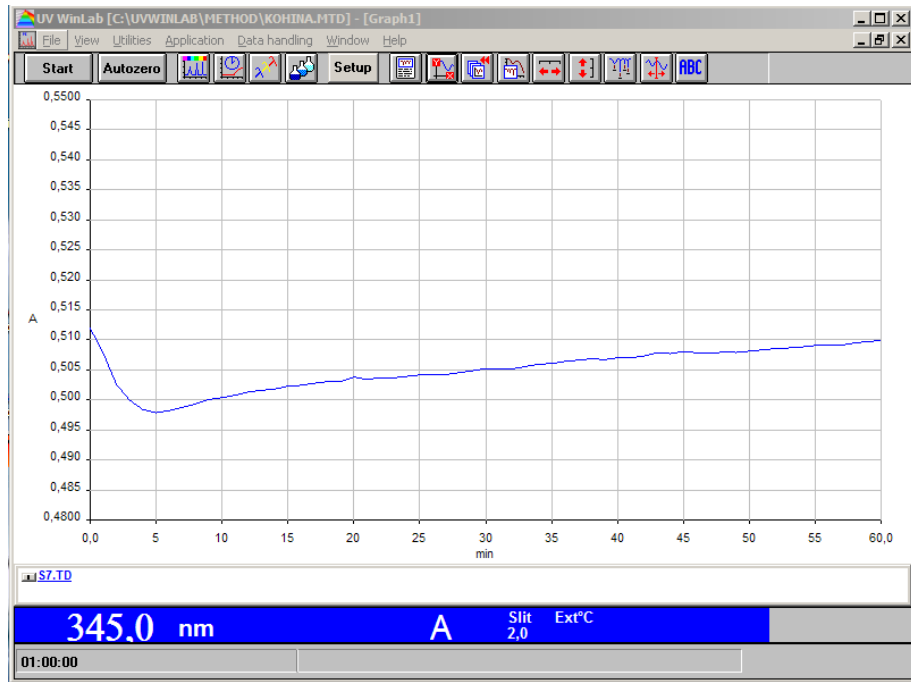
Kuvio 1. Nitraatin kuvaaja spektrofotometrillä skannatusta näytteestä.



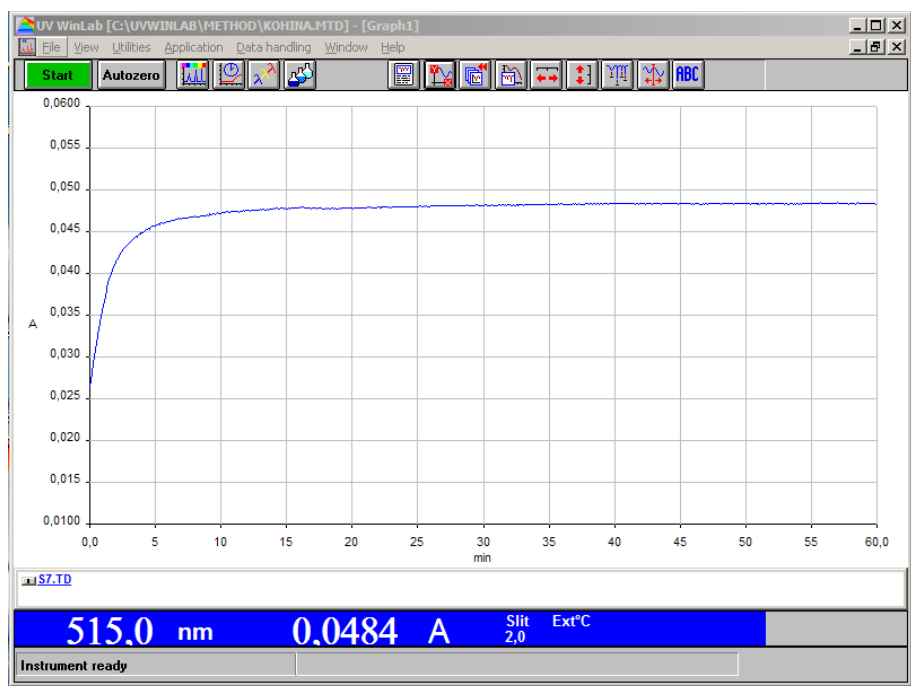
Kuvio 2. Nitriitin kuvaaja spektrofotometrillä skannatusta näytteestä.

Spektrin perusteella nitraatinäytteellä on kaksi aallonpituusmaksimia, joista toinen on 266,97 nm ja toinen 331,30 nm. Nitriitin aallonpituusmaksimiksi saatiin spektrin perusteella 519,65 nm. Aallonpituusmaksimit eroavat hieman mittausaallonpituuksista. Spektreistä kuitenkin nähdään, että molempien näytteiden spektrit muodostavat aallonpituusmaksimin lähistöllä huipun, joka on melko laakea. Nitraatilla aallonpituus 345 nm osuu samalle huipulle, ja absorbanssi on molemmilla aallonpituuksilla suurin piirtein sama. Myös nitriitin mittausaallonpituus 515 nm ja aallonpituusmaksimi 519,65 nm osuvat samalle huipulle eikä aallonpituuksien absorbanseilla ole merkittävää eroa. Näin ollen valmistajan asettamilla mittausaallonpituuksilla saataisiin näytteistä lähes sama tulos kuin jos mittausaallonpituutena käytettäisiin aallonpituusmaksimia.

Mittausajan optimointia varten valmistetuista ja spektrofotometrillä mitatuista näytteistä saatiin kuvaajat, jotka ovat kuvioissa 3 ja 4.



Kuvio 3. Nitraatin mittausajan optimointi.



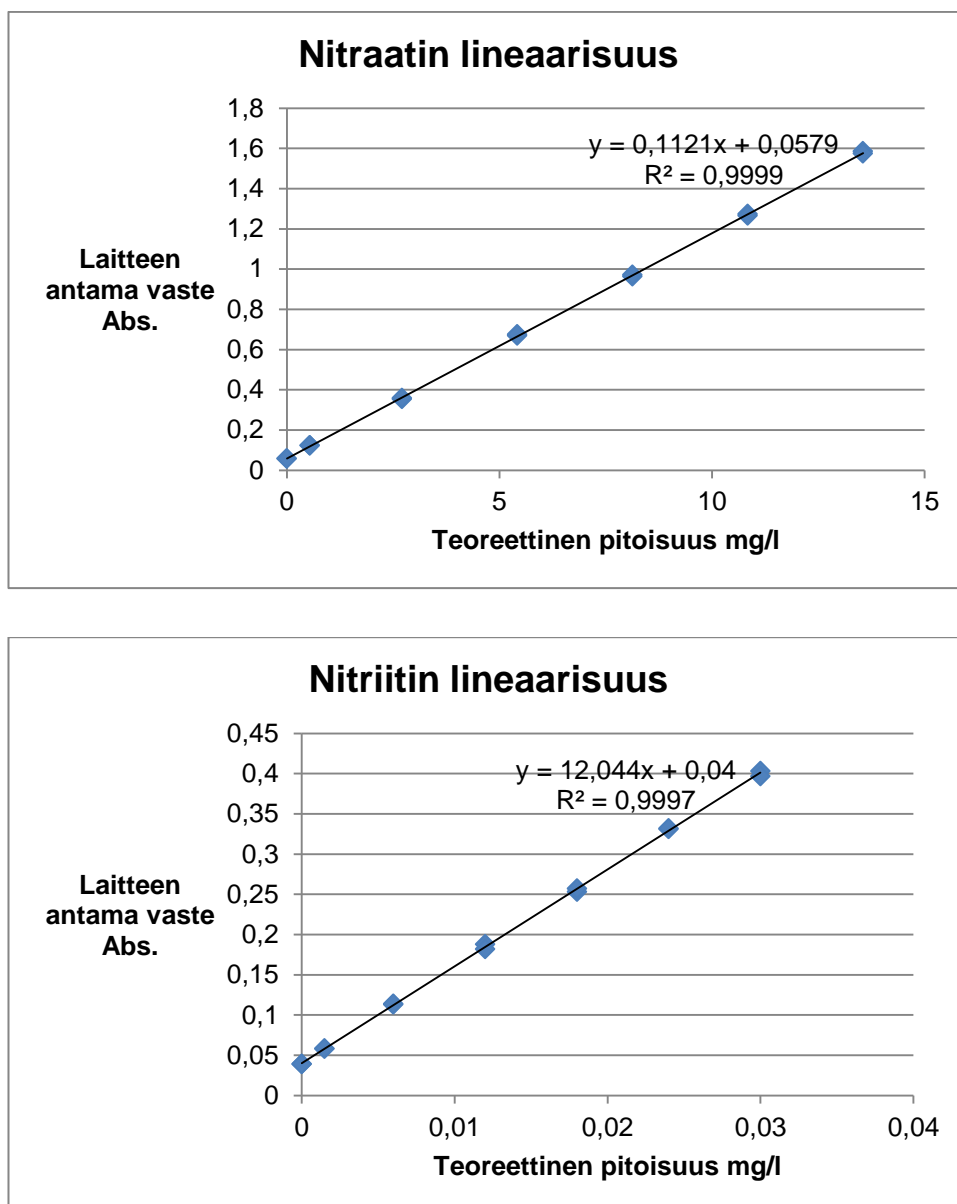
Kuvio 4. Nitriitin mittausajan optimointi.

Kuvaajan perusteella nitraatin absorptio laskee ensin nopeasti ja viiden minuutin kuluttua lähtee hitaasti nousemaan. Absorptio nousee hieman koko 1 h mittauksen ajan, mutta absorption muutos on kuvaajan perusteella 10 min jälkeen 1 h asti vain n. 0,010 A. Tällaisella absorbanssin muutoksella ei ole merkittävää vaikutusta lopputulokseen. Nitriitin absorptio nousee kuvaajan perusteella nopeasti ja tasaantuu 5 min jälkeen. 10 min kuluttua reaktion alkamisesta absorbanssi ei enää muutu seuraavan 50 min aikana.

Mittaustulosten perusteella sekä nitraatin että nitriitin absorptiomaksimi ei aivan osu valmistajan antamaan mittausaallonpituuteen mutta sillä ei ole näytteen mittauksen kannalta merkitystä, koska absorbanssi on molemmilla aallonpituuksilla lähes sama. Mittausajan optimoinnissa absorption muutoksen perusteella valmistajan antamat mittausajat ovat hyvät. Molemmista kuvaajista kuitenkin nähdään, että molempien näytteiden absorptio pysyy näytteenkäsittelystä seuraavan tunnin ajan melko stabiilina, joten näytteiden mittausta ei ole välttämättöntä suorittaa välittömästi reaktioajan kuluttua.

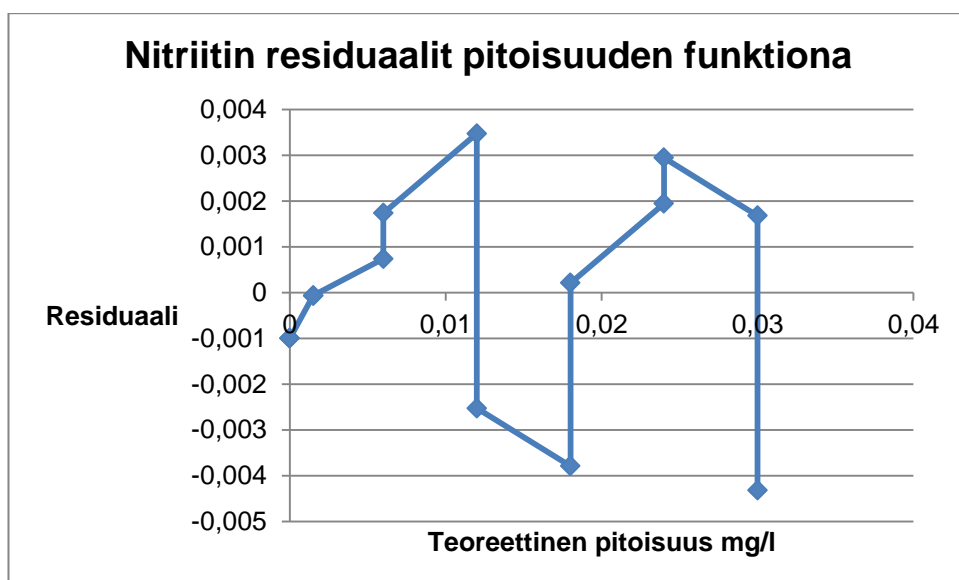
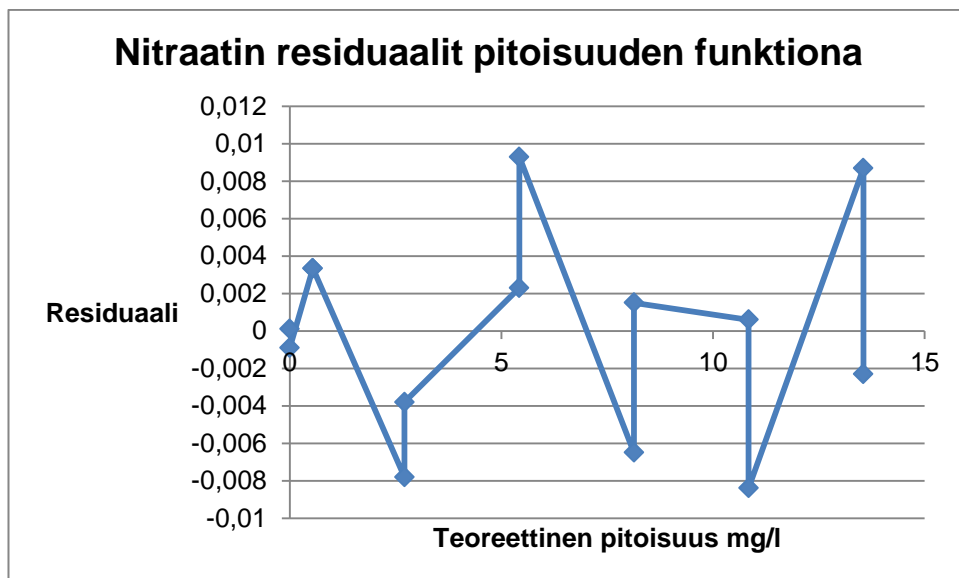
6.2 Lineaarisuus

Lineaarisuutta tutkittiin sillä alueella, jonka valmistaja oli ilmoittanut mittausalueeksi. Nitraatin mittausalueeksi oli ilmoitettu 0,23 – 13,5 mg/l ja nitriitille 0,0015 – 0,030 mg/l. Kalibroitisuorista saatiin suorien korrelaatiokertoimien neliöt. Nitraatin korrelaatiokertoimen neliöksi saatiin 0,9999 ja nitriitin korrelaatiokertoimen neliöksi 0,9997. Kalibroitisuorat ovat kuviossa 5.



Kuvio 5. Nitraatin ja nitriitin kalibrointisuorat.

Kalibrointisuorien yhtälöiden perusteella laskettiin molemmille menetelmille residuaalit. Residuaalikuvaajien (kuvio 6) perusteella arvioitiin lineaarisen mallin soveltuvuutta kalibrointiin.



Kuvio 6. Kalibrointisuorien residuaalikuvaajat.

Kalibrointisuoran ollessa täysin lineaarinen residuaalit jakautuvat niin, että joka toinen on nollatason yläpuolella ja joka toinen alapuolella (14). Kuvaajista nähdään, että residuaalit eivät kummallakaan menetelmällä jakaantuneet täysin ihanteellisesti, mutta pisteitä on tasaisesti nollatason molemmin puolin. Residuaalit eivät myöskään näytä olevan riippuvaisia pitoisuudesta, vaan residuaalien suuruus vaihtelee koko pitoisuusalueella tasaisesti. Residuaalien perusteella

kalibroinnissa ei myöskään havaittu poikkeavia arvoja. Kuvaajien perusteella menetelmien voidaan sanoa olevan lineaarisia tutkitulla alueella.

6.3 Määrittäysraja

Valmistajan ilmoittamat määrittäysrajat olivat nitraatille 0,23 mg/l ja nitriitille 0,0015 mg/l. Määrittäysrajaa varten mitatuista nollanäytteistä laskettiin keskihajonta, ja sen perusteella määrittäysraja. Määrittäysrajaksi saatiin nitraattimenetelmälle 0,10 mg/l ja nitriittimenetelmälle 0,006 mg/l.

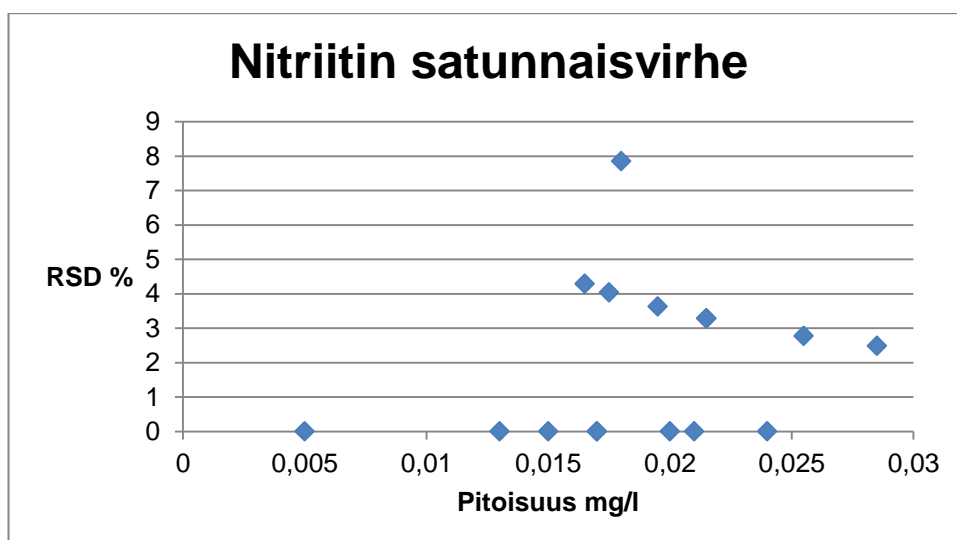
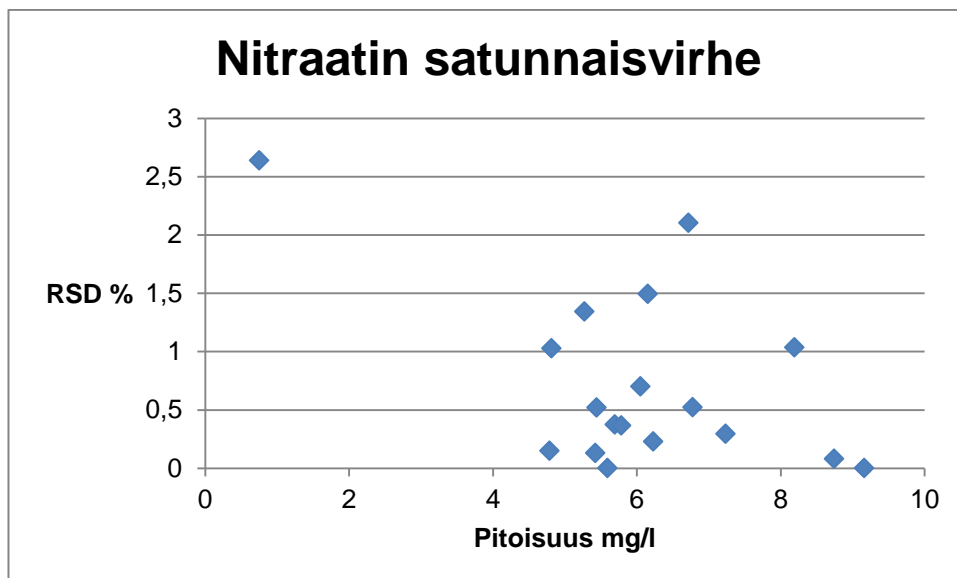
Nitraatin määrittäysrajaksi saatiin pienempi kuin valmistajan antama määrittäysraja, mutta nitriitin määrittäysrajassa ei päästy edes lähelle valmistajan antamaa rajaa.

6.4 Systemaattinen virhe

Systemaattisen virheen määrittäyksessä nitriitti-menetelmästä saatiin hyvät tulokset, mutta nitraatti-menetelmässä havaittiin jonkin verran systemaattista virhettä. Saantokokeessa mitatuista näytteistä saatiin nitriitin saannoksi 101 %, mutta nitraatin saanto jäi 84 %:iin. Tuloksien keskiarvosta laskettiin virhe, jonka mukaan nitraattinäytteiden tulokset jäivät keskimäärin 0,36 mg alle todellisen pitoisuuden. Nitriittimäärittäyksissä sen sijaan virhettä oli vain 0,0001 mg.

6.5 Satunnaisvirhe

Satunnaisvirhettä arvioitiin rinnakkaisten määrittäysten keskiarvoista lasketuista suhteellisista keskihajonnoista. Suhteellisista keskihajonnoista piirrettiin kuvaajat pitoisuuden funktiona. Kuvaajat ovat kuviossa 7.



Kuvio 7. Nitraatin ja nitraatin keskihajonnat pitoisuuden funktiona.

Kuvaajista nähdään, että molemmilla menetelmillä mitattujen näytteiden mittaus tulokset yhtä lukuun ottamatta keskittyvät melko pienelle pitoisuusalueelle. Kuvaajien perusteella kuitenkin näyttäisi, ettei pitoisuudella ole merkitystä rinnakkaismääritysten väliseen hajontaan.

Suhteelliset keskihajonnat yhdistämällä saatiin suhteelliseksi keskihajonnaksi nitraatille 0,85 % ja nitriitille 7,67 %. Yhdistetyistä suhteellisista keskihajonnoista

laskettiin satunnaisvirheen luottamusvälit 95 % todennäköisyydellä. Nitraatin luottamusväliksi saatiin $\pm 1,8$ % ja nitriitin luottamusväliksi $\pm 16,3$ %.

6.6 Tarkkuus

Tarkkuuden arvioinnissa käytettiin referenssimateriaaleja, joiden pitoisuus tunnetaan tarkasti. Nitraatin tarkkuuden määrittämiseen käytetyn referenssimateriaalin pitoisuus oli $4,96 \pm 0,06$ mg/l 99 % luottamusvälillä. Nitriitin tarkkuuden määrittämiseen käytettiin referenssimateriaalia, jonka pitoisuus oli 15,23 µg/l. Kaikkien määritysten keskiarvoksi saatiin nitraatille 4,83 mg/l ja nitriitille 15,25 µg/l. Tuloksien poikkeavuutta todellisesta arvosta arvioitiin t-testillä 95 % luottamusvälillä. T-testistä saatiin nitraatille testisuureen arvoksi 19,299, kun vertailuarvo oli 2,064. Nitraatin määrittämisessä saatu ero on siis todella merkittävä. Nitriitin määrittämisessä t-testissä saatiin testisuureen arvoksi 0,122, joka jää vertailuarvon 2,064 alapuolelle. Testin perusteella nitraattimenetelmällä saatavat tulokset eivät ole kovin tarkkoja, kun taas nitriittimenetelmällä saatavat tulokset ovat.

6.7 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus saatiin määritettyä, kun oli ensin määritetty systemaattinen virhe ja satunnaisvirhe. Systemaattisen virheen määrittämiseksi saatiin nitraattinäytteiden määrittämisen ja teoreettisen arvon erotuksen keskihajonnaksi 1,199. Nitriittinäytteiden määrittämisen ja teoreettisen arvon erotuksen keskihajonta oli 1,579. Satunnaisvirheen määrittämiseksi saatiin nitraatin luottamusväliksi $\pm 1,8$ % ja nitriitin luottamusväliksi $\pm 16,3$ %. Mittausepävarmuus saatiin yhdistämällä nämä kaksi hajontaa. Jotta mittausepävarmuus ei olisi liian optimistinen, laskettiin vielä laajennettu epävarmuus kertomalla mittausepävarmuus kahdella, jolloin se vastaa 95 % luottamusväliä. Nitraatin laajennetuksi mittausepävarmuudeksi saatiin 6,5 % ja nitriitin epävarmuudeksi 49,1 %.

6.8 Näyteliuoksen stabiilisuus, lämpötilan ja näytteenkäsittelyn vaikutus

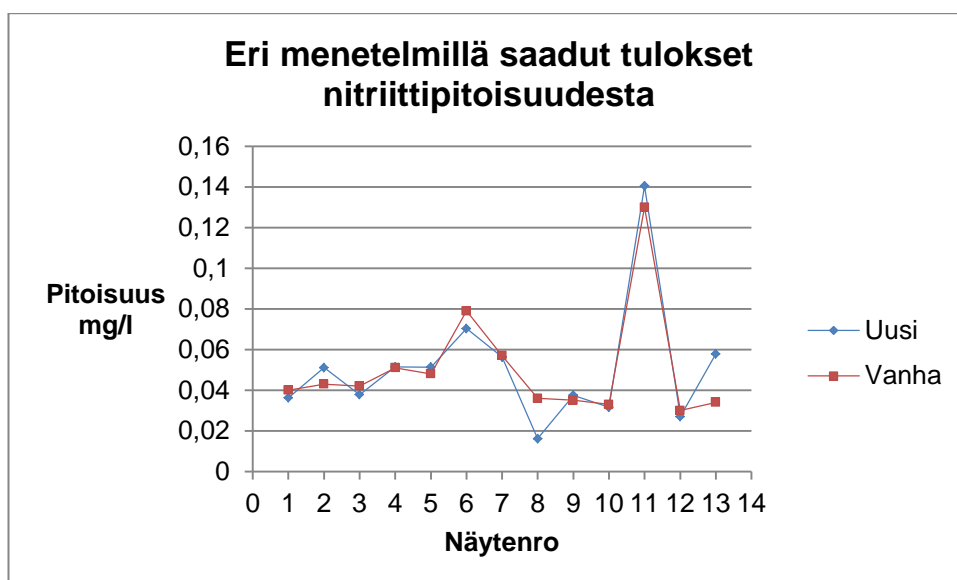
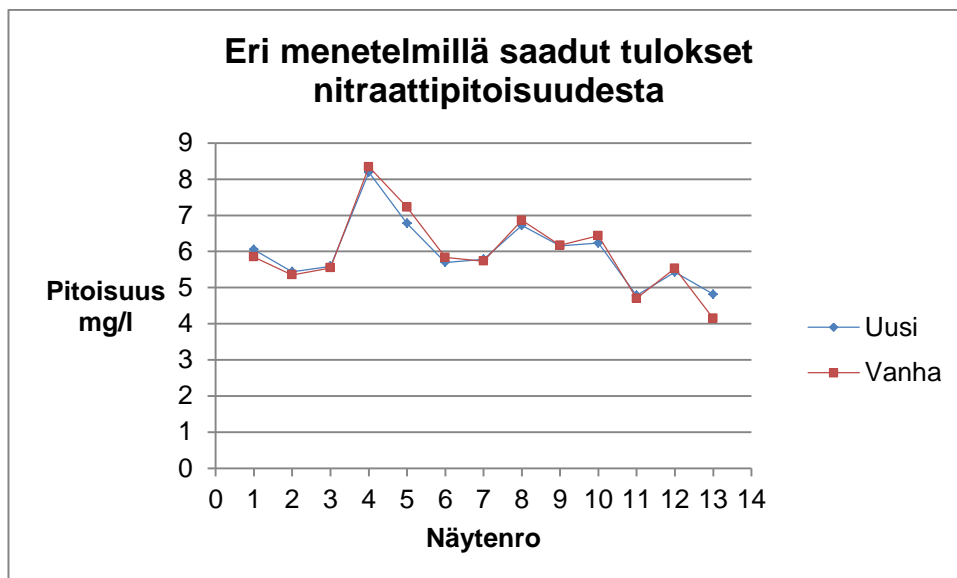
Näytteen stabiilisuuden tutkimisessa havaittiin, että nitraattipitoisuus säilyi kolmen vuorokauden aikana samana. Nitriittipitoisuus kasvoi ensimmäisen vuorokauden aikana, mutta kolmen vuorokauden jälkeen pitoisuus oli laskenut n. puoleen alkuperäisestä.

Lämpötilan vaikutusta tutkittaessa havaittiin, että kummallakin menetelmällä jääkaappilämpöisistä näytteistä saatiin hieman pienemmät tulokset kuin huoneenlämpöisistä ja 25 °C:sta.

Näytteen käsittelyn vaikutusta tutkittaessa näyte esikäsiteltiin kolmella eri tavalla. Näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaista näytettä ilman esikäsittelyä, sentrifugoimalla näyte ennen käsittelyä ja sakkaamalla ja sen jälkeen sentrifugoimalla näyte. Esikäsittelyn havaittiin vaikuttavan näytteeseen: suurin tulos saatiin käsittelemättömästä näytteestä ja pienin tulos sakatusta näytteestä.

6.9 Menetelmävertailu

Menetelmien vertaamista varten määritetyistä näytteistä laskettiin t-testin avulla, eroavatko valmisputkimenetelmillä saadut tulokset merkittävästi FIA-analysaattorilla saaduista tuloksista 95 % luottamusvälillä. Kuvaajat määritettyjen näytteiden eroista vanhalla ja uudella menetelmällä on esitetty kuviossa 8.



Kuvio 8. FIA-analysaattorilla ja valmisputkimenetelmillä saadut tulokset samoista näytteistä.

Nitraatti-menetelmällä saaduista tuloksista saatiin t-arvoksi -0,058 vertailuarvon ollessa 2,160. Nitriittimenetelmällä saaduista tuloksista saatiin t-arvoksi 1,000. Kummallakaan menetelmällä saaduilla tuloksilla ei siis voitu katsoa olevan merkitsevää eroa FIA-analysaattorilla saatuihin tuloksiin 95 % luottamusvälillä. Menetelmien päivittäisessä käytössä tarvittavia parametreja verrataan taulukossa 6.

Taulukko 6. FIA-menetelmien ja valmisputkimenetelmien vertailu.

	Nitriitti FIA	Nitraatti FIA	Nitriitti LCK 541	Nitraatti LCK 339
Määritysraja	0,030 mg/l	0,050 mg/l	0,006 mg/l	0,10 mg/l
Mittausepä- varmuus	0-250 µg/l: 25 µg >250 µg/l: 10 %	0-2 mg/l: 200 µg >2 mg/l: 10 %	49,1 %	6,5 %

Vaikka nitraatin ja nitriitin analysoinnista saaduissa tuloksissa ei havaittu menetelmäkohtaisia merkittäviä eroja, on menetelmien parametreissa havaittavissa selviä eroja. Nitriitin määritysraja ja nitraatin mittausepävarmuus olivat uusilla menetelmillä paremmat mutta nitriitin mittausepävarmuus oli uudella menetelmällä merkittävästi suurempi. Myös nitraatin määritysraja oli uudella menetelmällä hieman isompi kuin vanhalla menetelmällä.

7 YHTEENVETO

Työn tarkoituksena oli validoida nitraatin ja nitriitin valmisputkianalyysimenetelmät jätevesien analysoimista varten. Menetelmillä tavoiteltiin nopeutta ja tehokkuutta näytteiden analysointiin, sekä pyrittiin myös säästämään FIA-analysaattoria sitä kuormittavilta jätevesinäytteiltä. Tavoitteena oli myös, että molemmat menetelmät saataisiin akkreditoitua, jotta voitaisiin osoittaa asiakkaille niiden luotettavuus ja toimivuus.

Validoinnissa saatujen tuloksien perusteella kummallakaan menetelmällä saaduissa tuloksissa ei ole merkittävää eroa FIA-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Kuitenkaan kaikkien validointitestien tulokset eivät vastanneet odotuksia.

Nitriittimenetelmä osoittautui hyvin lineaariseksi. Nitriitin kalibroitaisuoran korrelaatiokertoimen neliöksi saatiin 0,9997 ja residuaalikuvaajan perusteella lineaarinen malli soveltui nitriitin kalibrointiin hyvin. Menetelmä osoittautui myös tarkaksi, ja saantokokeesta saatiin saannoksi 101 %. Mitatuissa näytteissä systemaattista virhettä ei ollut kuin 0,0001 mg. Satunnaisvirheeksi saatiin 95 % luottamusvälillä $\pm 16,3$ %. Koska satunnaisvirheen osuus oli niin suuri, tuli myös mittausepävarmuudesta suuri. Menetelmän mittausepävarmuudeksi 95 % luottamusvälillä saatiin 49,1 %. Määritysrajan määrittämisessä ei päästy valmistajan lupaamaan 0,0015 mg/l:aan, vaan määritysrajaksi saatiin 0,006 mg/l. Vaikka määritysraja oli iso verrattuna valmistajan antamaan määritysrajaan, oli se kuitenkin huomattavasti pienempi kuin FIA-menetelmän määritysraja 0,030 mg/l. Näyteliuos ei stabiilisuustestin mukaan säilynyt kovin hyvin, ja mittauslämpötilalakin oli pieni vaikutus tuloksiin.

Nitriittimenetelmän suureen mittausepävarmuuteen ja korkeaan määritysrajaan vaikutti merkittävästi menetelmän pieni pitoisuustaso. Näin pienellä pitoisuustasolla pienikin muutos tuloksissa on prosentuaalisesti iso. Menetelmän käytössä pienillä muutoksilla ei kuitenkaan ole lopputuloksen kannalta suurta merkitystä, sillä menetelmällä on tarkoitus analysoida jätevesiä.

Nitraattimenetelmä osoittautui myös hyvin lineaariseksi. Nitraatin kalibrointisuoran korrelaatiokertoimen neliöksi saatiin 0,9999 ja residuaalikuvaajasta nähtiin, että lineaarinen malli soveltui kalibrointiin. Määritysrajaksi saatiin 0,10 mg/l, joka oli paljon pienempi kuin valmistajan lupaama 0,23 mg/l. Satunnaisvirhe oli 95 % luottamusvälillä vain $\pm 1,8$ %. Saantokokeen tulokset sen sijaan osoittivat, että menetelmässä on systemaattista virhettä, ja saanto jäi vain 84 %:iin. Systemaattisen virheen osuus mitatuissa näytteissä oli n. 0,36 mg. Menetelmän tarkkuuden määrittämisessä tunnetusta referenssimateriaalista saatiin tulokseksi pitoisuus, joka t-testin mukaan oli merkittävästi pienempi kuin todellinen arvo. Mittausepävarmuudeksi menetelmälle saatiin 6,5 %. Stabiilisuustestissä havaittiin, että näyteliuos säilyy hyvin, eikä tulostaso muuttunut kolmen vuorokauden säilytyksen aikana. Mittauslämpötilalla oli pieni vaikutus tuloksiin.

Nitraattimenetelmällä saatuja tuloksia saataisiin hieman paremmaksi nollakorjauksella, sillä nollanäyte antoi pienen negatiivisen vasteen. Tämä korjaisi systemaattista virhettä ja tarkkuutta hieman, mutta ne eivät korjaantuisi kokonaan. Näytteenkäsittelyllä systemaattinen virhe voitaisiin saada häviämään, sillä vanhassa menetelmässä näytteistä sakataan häiritsevät komponentit pois. Tätä ei kuitenkaan tutkittu riittävästi osittain ajan puutteen takia ja osittain kustannussyistä.

Aallonpituusmaksimit erosivat molemmilla menetelmillä jonkin verran valmistajan antamista mittausaallonpituuksista. Spektrien perusteella kuitenkin tulkittiin, ettei aallonpituusmaksimeita ole tarpeen muuttaa. Molemmilla menetelmillä näytteestä muodostui mittausaallonpituuden alueelle melko laakea huippu, ja sekä aallonpituusmaksimi että mittausaallonpituus osuivat saman huipun alueelle, ja niiden absorbanssi oli suurin piirtein sama. Myös mittausaika päätettiin pitää valmistajan ilmoittamana, sillä reaktio oli kuvaajan mukaan ehtinyt tapahtua valmistajan antaman mittausajan kuluessa ja absorbanssi tasaantua. Mittausajasta todettiin kuitenkin, ettei kummallakaan menetelmällä ole merkitystä lopputulokseen, vaikka mittaus hieman viivästyisi annetusta ajasta.

Validointi saatiin suoritettua suunnitelmien mukaisesti. Ajan puutteen takia ja myös kustannussyistä analysoitujen näytteiden määrä jäi turhan vähäiseksi.

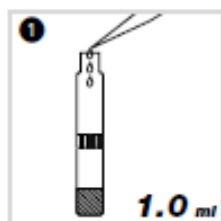
Esimerkiksi näytteen käsittelyn vaikutusta tutkittiin vain yhdellä näytteellä. Jätevesinäytteet ovat matriisiltaan hyvin erilaisia, ja yhden näytteen perusteella on mahdotonta sanoa, onko esikäsittely tarpeen vai ei. Esimerkiksi nitraattimenetelmän pieneksi jäänyt saanto johtui luultavasti jäteveden matriisissa olevista määrittystä häiritsevistä komponenteista. Saantokoe olisi ollut hyvä toteuttaa myös näytteillä, jotka olisi esikäsitelty samalla tavoin kuin FIA-menetelmällä, jotta oltaisiin nähty määrittystä häiritsevien komponenttien vaikutus analysointiin. Lisäksi testejä olisi ollut hyvä tehdä useammanlaisilla näytteillä, jotta oltaisiin nähty, miten erityyppisten jätevesien matriisit vaikuttavat tuloksiin.

Vaikka kaikista validointitesteistä ei saatu toivottuja tuloksia, menetelmät päätettiin ottaa käyttöön sillä perusteella, että niitä tullaan käyttämään jätevesien analysoimiseen. Jätevesinäytteistä saatavien tulosten ei ole tarpeen olla niin tarkkoja kuin puhtaista vesistä saatujen tulosten, ja menetelmien voitiin todeta soveltuvan hyvin käyttötarkoitukseensa. Molempiin menetelmiin otettiin käyttöön myös sakkaus näytteen esikäsittelynä, vaikka sitä ehdittiinkin tutkia vain vähän. Sitä on kuitenkin tutkittu jo aiemmin FIA-menetelmän yhteydessä ja se on havaittu tarpeelliseksi. Molemmille menetelmille haettiin myös akkreditointia, ja tarkastus meni molempien menetelmien osalta hyvin. Kummallekin menetelmälle myönnettiin akkreditointi maaliskuussa 2012.

LÄHTEET

- 1 Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy (2012a) Laatukäsikirja v.3.16
- 2 Valtion ympäristöhallinto (2012) viitattu 27.2.2012, saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa) www.ymparisto.fi
- 3 Karttunen, E., Tuhkanen, T., Kiuru, H. (2004), RIL 124-2 Vesihuolto II, Vammalan kirjapaino Oy
- 4 Lyytimäki, J., Hakala, H. (2008) Ympäristön tila ja suojelu Suomessa, 2. painos, Gaudeamus Helsinki University Press Oy Yliopistokustannus, Helsinki
- 5 Karttunen, E., Tuhkanen, T. (2003), RIL 124-1 Vesihuolto I, Vammalan kirjapaino Oy
- 6 Manahan, S. E. (2011), Water Chemistry: Green Science and Technology of Nature's Most Renewable Resource, Taylor and Francis Group, LLC, USA
- 7 Scragg, A. (2010) Environmental biotechnology, 2. painos, Oxford University Press, CPI Antony Rowe, Great Britain
- 8 Suomen Standardisoimisliitto SFS Ry, Suomen Ympäristökeskus (1997) SFS-EN ISO 13395 Veden laatu. Nitriitti- ja nitraattitypen sekä niiden summan määrittäminen spektrofotometrisesti CFA- ja FIA-tekniikalla, Helsinki
- 9 Hach Lange LTD (2012), Lange Tests, viitattu 12.3.2012, saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa) www.hach-lange.co.uk
- 10 Hach company (2012) DR 2800 User Manual, viitattu 11.3.2012, saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa) www.hach.com
- 11 The Perkin Elmer corporation (1995), Specifications to Lambda 12 and Lambda 14 UV/VIS Spectrometers, B050-4251/6.94A, Germany
- 12 Lange (2005), kyvettitestin LCK 339 lyhyt analyysiohje
- 13 Lange (2001) kyvettitestin LCK 541 lyhyt analyysiohje
- 14 Mäkinen, I., Suortti, A-M., Saares, R., Niemi, R., Marjanen, J.J. (1996) Ohjeita Ympäristönäytteiden Kemiallisten Analyysimenetelmien validointiin, Suomen Ympäristökeskus
- 15 Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy (2012b) Menetelmäohje A18 v.10 Veden nitriitti- ja nitraattitypen ja niiden summan määrittäminen FIA-tekniikalla
- 16 Harris, Daniel C. (2003) Quantitative Chemical Analysis, 6. painos, W. H. Freeman and Company, United States of America

Liite 1. Valmisputkipakkauksen LCK 339 analyysiohje



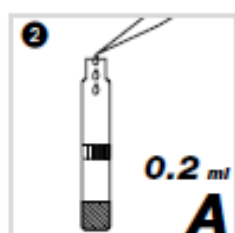
1.0 ml Probe *langsam* pipettieren.

Pipetter *lentement 1.0 ml* d'échantillon.

Pipettare *con attenzione 1.0 ml* di campione.

Langzaam 1.0 ml monster pipetteren.

Slowly pipette **1.0 ml** sample.



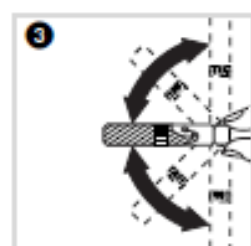
0.2 ml Lösung LCK 339 **A** *langsam* pipettieren.

Pipetter *lentement 0.2 ml* de la solution LCK 339 **A**.

Pipettare *con attenzione 0.2 ml* di soluzione LCK 339 **A**.

Langzaam 0.2 ml oplossing LCK 339 **A** pipetteren.

Slowly pipette **0.2 ml** solution LCK 339 **A**.



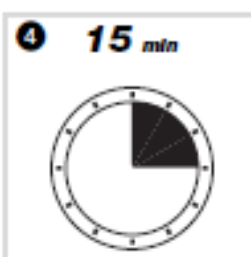
Küvette verschließen und schwenken, bis keine Schlieren mehr zu beobachten sind.

Fermer la cuve et mélanger le contenu en la retournant plusieurs fois de suite jusqu'à ce que le mélange soit complet.

Tappare la cuvetta e mescolare accuratamente fino a miscelazione completa (assenza di striature).

Kuвет sluiten en zwenken tot er geen stroopdraden meer aanwezig zijn.

Close cuvette and invert a few times until no more streaks can be seen.



Nach **15 min** Küvette außen gut säubern und auswerten.

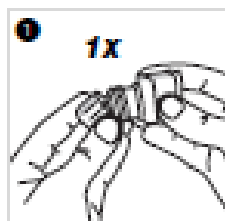
Attendre **15 min**, bien nettoyer l'extérieur de la cuve et mesurer.

Dopo **15 min** pulire bene la cuvetta esternamente e leggere.

Na **15 min** het kuwet van buiten goed reinigen en meten.

After **15 min** thoroughly clean the outside of the cuvette and evaluate.

Liite 2. Reagenssisarjan LCK 541 analyysiohje



Nach Öffnen des MicroCap®-Behälters **langsam 1 MicroCap® A** (LCK 541 A) in die vorgesehene Dosierhilfe des Deckels geben.

Après ouverture du récipient à MicroCap, déposer **lentement 1 MicroCap A** (LCK 541 A) dans l'auxiliaire de dosage prévu à cet effet, dans le couvercle.

Dopo l'apertura del contenitore del MicroCap, versare **con attenzione 1 MicroCap A** (LCK 541 A) nel tappo con il dispensatore.

Na het openen van de MicroCap verpakking, **langzaam 1 MicroCap A** (LCK 541 A) in de dosermuile van de dop opvangen.

After opening the MicroCap container, **slowly** introduce **1 MicroCap A** (LCK 541 A) into the metering aid of the lid.



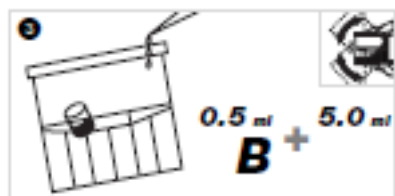
Anschließend MicroCap® **direkt** in die bereits geöffnete 50 mm-Kunststoffküvette (LZP 341) geben.

Ensuite, placer le MicroCap **directement** dans la cuve plastique de 50 mm (LZP 341) préalablement ouverte.

Dosare il MicroCap **direttamente** nella cuvetta da 50 mm (LZP 341) aperta.

Aansluitend de MicroCap **direct** in de reeds geopende 50 mm kunststofkuvet (LZP 341) doseren.

Then introduce the MicroCap **directly** into the open 50 mm plastic cuvette (LZP 341).



Nacheinander zügig in die 50 mm Rechteckküvette pipettieren: **0.5 ml Lösung B** (LCK 541 B) / **5.0 ml Probe**

Küvette **sofort** verschließen und schwenken bis Lyophilisat des MicroCaps® gelöst ist.

Pipetter **à la suite, consécutivement** dans la cuve rectangulaire de 50 mm: **0.5 ml** de solution **B** (LCK 541 B) / **5.0 ml** d'échantillon

Forme la cuve **immédiatement** et mélanger jusqu'à ce que le lyophilisat du MicroCaps soit partiellement dissous.

Pipettare nella cuvetta rettangolare da 50 mm in **rapida successione**: **0.5 ml** di soluzione **B** (LCK 541 B) / **5.0 ml** di campione

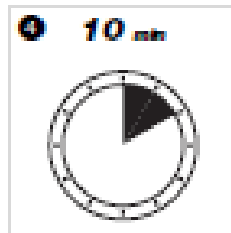
Chiudere **subito** la cuvetta e mescolare fino a scioglimento completo del liofilizzato nel MicroCap.

Direct na elkaar in het 50 mm-rechthoek pipetteren: **0.5 ml** oplossing **B** (LCK 541 B) / **5.0 ml** monster

Onmiddellijk sluiten en zwenken totdat het lyofilisaat uit de MicroCaps opgelost is.

Pipette in **quick succession** to the 50 mm rectangular cuvette: **0.5 ml** solution **B** (LCK 541 B) / **5.0 ml** sample

Close cuvette **immediately** and invert a few times until the freeze-dried contents of the MicroCaps are dissolved.



Nach **10 min** KÜvette noch einmal schwenken,
außen gut säubern und auswerten.

Auf Luftblasen achten!

Attendre **10 min**, mélanger de nouveau,
bien nettoyer l'extérieur de la cuve et mesurer.

Attention aux bulles d'air!

Dopo **10 min**, mescolare nuovamente, pulire
bene la cuvetta esternamente e leggere.

Fer attenzione alle bolle d'aria!

Na **10 min** kuvet opriauw zwenken, van
buiten goed reinigen en meten.

Let op luchtballen!

After **10 min**, invert a few times more,
thoroughly clean the outside of the cuvette
and evaluate.

Take care that there are no air bubbles!

Liite 3. Validoinnissa mitattujen näytteiden mittaustulokset

Nollanäytteet:

Nitraatti		Nitriitti	
Tulos 1 mg/l	Tulos 2 mg/l	Tulos 1 mg/l	Tulos 2 mg/l
-0,078	-0,056	0,000	0,000
-0,099	-0,070	0,000	0,000
-0,083	-0,110	-0,001	-0,001
-0,070	-0,107	0,000	-0,001
-0,092	-0,081	-0,001	0,000
-0,075	-0,038	-0,001	0,000
-0,080	-0,084	-0,001	-0,001
-0,062	-0,096	0,000	-0,001
-0,102	-0,113	-0,001	-0,001
-0,088	-0,078	0,001	0,000
-0,089	-0,091	0,000	-0,001
-0,106	-0,082	0,000	-0,001

Kontrolliliuokset:

Nitraatti		Nitriitti	
Tulos 1 mg/l	Tulos 2 mg/l	Tulos 1 mg/l	Tulos 2 mg/l
4,83	4,86	0,021	0,021
4,70	4,72	0,021	0,021
4,80	4,78	0,021	0,020
4,88	4,77	0,019	0,021
4,82	4,86	0,021	0,020
4,79	4,80	0,020	0,018
4,72	4,74	0,020	0,020
4,84	4,84	0,021	0,021
4,77	4,73	0,022	0,021
4,74	4,81	0,021	0,021
4,82	4,79	0,021	0,020

Referenssimateriaalit:

Nitraatti		Nitriitti	
Tulos 1 mg/l	Tulos 2 mg/l	Tulos 1 mg/l	Tulos 2 mg/l
4,82	4,82	0,016	0,016
4,83	4,75	0,016	0,016
4,83	4,80	0,015	0,015
4,82	4,80	0,016	0,016
4,81	4,84	0,015	0,016
4,86	4,84	0,015	0,015
4,81	4,80	0,015	0,015
4,85	4,87	0,015	0,015
4,77	4,73	0,016	0,016
4,81	4,87	0,015	0,014
4,82	4,79	0,014	0,013

Todelliset näytteet, nitraatti:

Näyttenumero	Uusi menetelmä		Vanha menetelmä	
	Tulos 1 mg/l	Tulos 2 mg/l	Tulos 1 mg/l	Tulos 2 mg/l
21478	6,02	6,08	5,70	5,99
21553	5,42	5,46	5,33	5,37
21658	5,59	5,59	5,68	5,41
21701	8,13	8,25	8,33	8,35
21796	6,8	6,75	7,26	7,19
21859	5,71	5,68	5,81	5,86
21885	5,8	5,77	5,80	5,66
21951	6,62	6,82	6,83	6,89
21991	6,22	6,09	6,21	6,13
22069	6,24	6,22	6,51	6,36
22135	4,78	4,79	4,70	-
22136	5,43	5,42	5,46	5,60
22174	4,85	4,78	3,99	4,30

Todelliset näytteet, nitriitti:

Näyttenumero	Uusi menetelmä		Vanha menetelmä	
	Tulos 1 mg/l	Tulos 2 mg/l	Tulos 1 mg/l	Tulos 2 mg/l
21478	0,040	0,040	0,036	0,036
21553	0,042	0,044	0,061	0,042
21658	0,042	0,044	0,039	0,037
21701	0,052	0,050	0,052	0,051
21796	0,048	0,048	0,051	0,051
21859	0,080	0,078	0,070	-
21885	0,056	0,058	0,057	0,056
21951	0,038	0,036	0,017	0,015
21991	0,036	0,034	0,037	0,038
22069	0,034	0,032	0,032	0,031
22135	0,130	0,130	0,141	-
22136	0,030	0,030	0,028	0,026
22174	0,034	0,034	0,059	0,056